

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA



**DEFECTOS EN LAS PROTEINAS RELACIONADAS CON
EL FACTOR H DEL COMPLEMENTO (FHRs) EN
PATOLOGIA RENAL**

TESIS DOCTORAL

Maria Elvira Bernabeu Herrero

Madrid, 2016

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID



**DEFECTOS EN LAS PROTEINAS RELACIONADAS CON
EL FACTOR H del COMPLEMENTO (FHRs) EN
PATOLOGIA RENAL**

Memoria para optar al título de Doctor

Maria Elvira Bernabeu Herrero

Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Margarita López Trascasa

Directora: Dra. Pilar Sánchez-Corral Gómez

IdiPAZ-Hospital Universitario La Paz

RESUMEN

El Síndrome Hemolítico Urémico atípico (SHUa) es una microangiopatía trombótica grave que afecta a la microvasculatura renal y se asocia con la disregulación del complemento causada por mutaciones o autoanticuerpos. La penetrancia y severidad de la enfermedad es modulada por la herencia de polimorfismos de "riesgo" en los genes del complemento *MCP* (Membrane Cofactor Protein o CD46), *CFH* (Complement Factor H) y *CFHR1* (Complement Factor H-Related 1). En esta tesis hemos analizado distintos aspectos genéticos e inmunológicos del SHUa.

En una primera parte se describe la prevalencia de mutaciones, la frecuencia de los polimorfismos de riesgo y la aparición de autoanticuerpos anti-fH en la cohorte española de SHUa (n=367). También se presenta la identificación de un polimorfismo en *CFHR3* (c.721C> T; rs379370) que está asociado con un mayor riesgo de SHUa, y está incluido en un haplotipo de riesgo extendido que abarca los genes *CFH-CFHR3-CFHR1*. Este haplotipo extendido integra polimorfismos en la región promotora de *CFH* y *CFHR3*, y se asocia con una peor evolución de la función renal y disminución de los niveles de factor H (fH). El haplotipo extendido de riesgo para SHUa *CFH-CFHR3-CFHR1* parece ser el mismo que ha sido asociado anteriormente con la protección contra infecciones meningocócicas, lo que sugiere que la variabilidad genética en esta región está limitada a unos pocos haplotipos extendidos, cada uno con efectos opuestos en diversas enfermedades humanas. Estos resultados sugieren que la combinación de variaciones cuantitativas y cualitativas en las proteínas del complemento codificadas por los genes *CFH*, *CFHR3* y *CFHR1* es clave para la asociación de estos haplotipos con la enfermedad.

La segunda parte de esta tesis, se centra en el reconocimiento y caracterización de una proteína híbrida formada por proteínas FHRs. Se ha descrito que en torno a un 10% de los pacientes de SHUa presentan reordenamientos anómalos en la región *CFH-CFHR1-CFHR5* pudiendo dar lugar a genes híbridos, entre otras alteraciones. Algunos de ellos generan proteínas anómalas con pesos moleculares diferentes que pueden ser detectados mediante un análisis por *Western-blot*. Se han descrito genes híbridos *CFH-CFHR1*, *CFHR1-CFH*, *CFHR3-CFHR1*, *CFHR1-CFHR1*, *CFHR2-CFHR5*, *CFHR5-CFHR5*, *CFH-CFHR3*. Todas las proteínas híbridas resultantes tienen sus funciones alteradas. En nuestro grupo se han identificado varios reordenamientos distintos, y en esta tesis se describe por primera vez el caso de un paciente con historia familiar de SHUa, con una proteína híbrida (FHR-3:FHR-4), que desarrolló la enfermedad durante la toma de anticonceptivos orales. Además, se muestra la segregación de esta proteína híbrida entre los miembros de la familia.

La última parte de la tesis está relacionada con los autoanticuerpos anti-factor H. Estos están presentes en un 10,6% de pacientes de SHUa, la mayoría de los cuales tienen deficiencia homocigota de la proteína FHR-1. Aunque se ha establecido el papel patogénico de los autoanticuerpos, se sabe poco acerca de sus características

moleculares y cambios en el tiempo. En esta tesis se describe la especificidad y otras características inmunológicas de autoanticuerpos anti-fH en la cohorte española de SHUa. Se incluyeron muestras seriadas de 7 pacientes. Los autoanticuerpos anti-fH en pacientes deficientes de FHR-1 (n=13) reconocen principalmente fH, su fragmento SCR19-20 y FHR-1, pero la especificidad de autoanticuerpos en pacientes que son homo- o heterocigotos para el gen *CFHRI* (n=6) es heterogénea. Aparte de la titulación total de anticuerpos, no se observaron cambios significativos durante el seguimiento en cada paciente. Además, aunque la avidez mostró variaciones entre los pacientes, en la mayoría de los casos el índice de avidez no cambió en el tiempo. La mayoría de los autoanticuerpos fueron IgG3, y todos menos tres eran específicos de cadenas ligeras kappa o lambda. Aunque el papel patogénico de los autoanticuerpos anti-fH en SHUa está bien establecido, este estudio muestra la heterogeneidad de autoanticuerpos en los pacientes, pero ninguna variación significativa en sus características con el tiempo en cada paciente. La presencia de una sola cadena ligera en los pacientes y el número limitado de epítomos reconocidos sugieren una respuesta de autoanticuerpos restringida en la mayoría de los pacientes.

En resumen, los resultados de esta tesis suponen un avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas y los mecanismos moleculares e inmunológicos implicados en Síndrome Hemolítico Urémico atípico.

ABSTRACT

Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) is a serious thrombotic microangiopathy that affects the renal microvasculature and is associated with deregulation of the complement system caused by mutations or autoantibodies. Penetrance and severity of the disease are modulated by hereditary risk polymorphisms of complement genes such as MCP (Membrane Protein Cofactor or CD46), CFH (Complement Factor H) and CFHR1 (Complement Factor H-Related 1). In this thesis we have analyzed different genetic and immunological aspects of aHUS.

In the first part, the prevalence of mutations, the frequency of risk polymorphisms and the appearance of anti-FH autoantibodies in aHUS Spanish cohort (n=367) are described. The identification of a polymorphism present in CFHR3 (c.721C> T; rs379370) that is associated with an increased risk of aHUS is also reported. This polymorphism is included in an extended risk haplotype spanning CFH-CFHR3-CFHR1 genes. This extended haplotype encodes polymorphisms in the promoter region of CFH and CFHR3, and is associated with a worse outcome of renal function and decreased levels of factor H (fH). The aHUS extended risk haplotype CFH-CFHR3-CFHR1 seems to be the same that has previously been associated with protection against meningococcal infections, suggesting that genetic variability in this region is limited to a few extended haplotypes, each with opposite effects in various human diseases. These results suggest that the combination of quantitative and qualitative variations in complement proteins encoded by CFH, CFHR1 and CFHR3 genes is key for the association of the disease with these haplotypes.

The second part of the thesis focuses on the recognition and characterization of a hybrid protein consisting of two FHRs. It has been described that around 10% of aHUS patients have abnormal rearrangements in the CFH-CFHR1-CFHR5 region, which may result in hybrid genes, among other changes. Some of them produce abnormal proteins with different molecular weights that can be detected by Western blot analysis. Hybrid genes between *CFH-CFHR1*, *CFHR1-CFH*, *CFHR3-CFHR1*, *CFHR1-CFHR1*, *CFHR2-CFHR5*, *CFHR5-CFHR5*, and *CFH-CFHR3* have been described. The hybrid proteins generated show altered functions. In our group, we have identified several distinct rearrangements, and in this thesis we describe for the first time the case report of a patient with a family history of aHUS and a hybrid FHR-3:FHR-4 protein who developed the disease during the uptake of oral contraceptives. The segregation of this hybrid protein among family members is also shown.

The third part of this thesis is related to anti-factor H antibodies. These are present in 10.6% of aHUS patients, most of whom with a homozygous deficiency for the FHR-1 protein. Although a pathogenic role of these autoantibodies has been well established, little is known about their molecular characteristics and changes over time. In this thesis, the specificity and other immunological characteristics of anti-FH antibodies in the Spanish cohort of aHUS are described. Finally, a total of 7 patients were included

and different serial samples from each patient were used. The anti-fH autoantibodies in FHR-1 deficient patients (n=13) mainly recognize fH, its SCR19-20 fragment and FHR-1, but the specificity of autoantibodies in patients who are homo- or heterozygous for the *CFHR1* gene (n=6) is heterogeneous. No significant changes, other than the total antibody titer, were observed during the follow-up of each patient. In addition, the avidity showed variations among patients, but in most cases, the avidity index did not change over time. Most autoantibodies were IgG3, and all but three had only kappa or lambda light chains. Although the pathogenic role of anti-fH autoantibodies in aHUS patients is well established, this study shows heterogeneity of patients' autoantibodies, but no significant variations in their characteristics over time for each patient. The presence of a single light chain in the patients, and the limited number of epitopes recognized, suggest a restricted autoantibody response in most patients.

In summary, the results of this thesis represent an advance in the knowledge of the genetic alterations and molecular and immunological mechanisms involved in atypical hemolytic uremic syndrome.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCION.....	11
1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	11
1.1. Vías de activación	12
1.2. Control del sistema del complemento. Los reguladores del RCA.....	16
1.2.1. Regulación de la C3-convertasa de la vía alternativa.....	17
1.2.2. Disociación de la C3-convertasa de la vía alternativa	18
1.2.3. Proteólisis de C3b	19
1.3. Factor H y proteínas FHRs.....	19
1.3.1. Dominios funcionales de factor H	20
1.3.2. Proteínas FHRs.....	21
2. EL SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO (SHU).....	24
2.1. Predisposición genética a SHUa	26
2.2. Tratamiento del SHUa.....	27
2.3. Autoanticuerpos anti-fH.....	28
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES Y CONTROLES	31
2. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	31
2.1. Muestras de Sangre-EDTA	31
2.2. Muestras de Suero	32
2.3. Muestras de Plasma-EDTA.....	32
3. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	32
4. CUANTIFICACIÓN DE FACTOR H	33
5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-FACTOR H (ANTI-FH).....	34
5.1 Detección de autoanticuerpos anti-fH.....	34
5.2. Caracterización de la subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos	34
5.3. Unión de los autoanticuerpos a fragmentos de fH recombinante	35
5.4. Ensayos de inhibición y mapeo del dominio de unión con anticuerpos monoclonales anti-FH.....	35
5.5. Determinación de la avidéz	35
5.6. Inmunocomplejos fH:anti-fH circulantes	36
6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y ENSAYOS DE <i>WESTERN-BLOT</i>	36
7. CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA FHR ANÓMALA	37
7.1 Separación cromatográfica	37
7.2 Análisis de espectrometría de masas	37
8. ANÁLISIS GENÉTICOS	38
8.1 Amplificación y secuenciación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
8.2. Análisis del número de copias mediante MLPA y microarray CGH	40
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
RESULTADOS.....	42
1. CARACTERIZACIÓN DE LA COHORTE SHUA ESPAÑOLA	42
1.1 Prevalencia de mutaciones, variantes de riesgo y anticuerpos anti-fH en la cohorte española de SHUa	42

2. ASOCIACIÓN DE VARIANTES DE FACTOR H, FHR-3 Y FHR-1 EN UN HAPLOTIPO EXTENDIDO QUE CONFIERE RIESGO A SHUA	45
2.1 Estudio de la variante c.721T en CFHR3 y su asociación con SHUa	45
2.2 Análisis de las variantes CFH(H3), CFHR3*B y CFHR1*B en SHUa y caracterización de un haplotipo extendido de riesgo	47
2.3 Relevancia clínica del haplotipo CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B, asociación con la evolución de la función renal y penetrancia de las mutaciones.....	49
2.4 Estudio del haplotipo CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B y su asociación con los niveles de fH y la protección frente a enfermedad por meningococo.....	52
3. PROTEÍNAS FHRs (FACTOR H-RELATED PROTEINS) ANÓMALAS	54
3.1. Caracterización del híbrido FHR-3-FHR-4 (HUS296). Caso clínico: HUS296	54
3.2. Identificación de una proteína anómala por <i>Western-blot</i>	55
3.3. Análisis mutacional en genes del complemento.....	55
3.4. Análisis del número de copias.....	56
3.5. Caracterización del gen híbrido CFHR3:CFHR4 mediante XL-PCR (EXtra Long Polymerase Chain Reaction).....	58
3.6. El gen CFHR3:CFHR4 y la proteína de 120kDa segregan en la familia de HUS296	61
3.7. Similitud de la proteína híbrida con otras proteínas FHRs y posible relevancia funcional.....	63
3.8. Purificación cromatográfica y deglicosilación de la proteína anómala de 120kDa	65
3.9. Deglicosilación.....	67
3.10. Análisis proteómico de la proteína anómala de 120 kDa.....	69
4. CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-FH EN PACIENTES SHUA ESPAÑOLES A LO LARGO DEL TIEMPO	70
4.1. Detección de autoanticuerpos anti-fH.....	70
4.2. Identificación de la clase, subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos	71
4.3. Unión de los autoanticuerpos a moléculas recombinantes de fH y FHRs	72
4.4. Inhibición de la unión de autoanticuerpos con anticuerpos monoclonales anti-fH.....	73
4.5. Determinación de la avididad de los autoanticuerpos anti-fH.....	75
4.6. Identificación de complejos fH:anti-fH en plasma.....	75
DISCUSIÓN.....	79
1. DISCUSIÓN HAPLOTIPO DE RIESGO A SHUA	79
2. DISCUSIÓN GEN HÍBRIDO EN LA PACIENTE HUS296	82
3. DISCUSIÓN AUTOAB.....	87
CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS	94

CLAVE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C4BP	<i>C4b-binding protein</i>
CFH	Gen codificante de factor H
CFI	Gen codificante de factor I
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
DAF	<i>Decay accelerating factor</i>
DMAE	Degeneración Macular Asociada a la Edad
dNTPs	Deoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	<i>Ethylendiamine-tetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunoadsorbent assay</i>
FHRs	<i>Factor H-Related Proteins</i>
GN	Glomerulonefritis
h	Horas
IgAN	Nefropatía por IgA
Kb	Kilobases
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MBL	<i>Mannose Binding Lectin</i>
MCP	<i>Membrane cofactor protein</i>
min	Minutos
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
Oligo	Oligonucleótido o cebador de PCR
pb	Pares de bases
PBLs	Leucocitos de sangre periferica (<i>Peripheral Blood Leukocytes</i>)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
RCA	<i>Regulators of complement activation</i>

rpm	Revoluciones por minuto
SCR	<i>Short consensus repeat</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS
SHU	Síndrome Hemolítico Urémico
SHUa	Síndrome Hemolítico Urémico atípico
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TCC	<i>Terminal Complement Complex</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Voltio
VA	Vía Alternativa

INTRODUCCION

1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento es el principal sistema humoral de la defensa inmune innata de los organismos vertebrados, que además participa activamente en la inmunidad adaptativa. Su misión esencial es defender al organismo de infecciones, ya que reconoce y elimina patógenos de distinta naturaleza.

Aunque se describió en 1896 por Jules Charles Bordet como un factor lábil al calor que "complementaba" la acción bactericida y hemolítica de los anticuerpos, el complemento es evolutivamente más antiguo que los anticuerpos y está muy conservado, con homología estructural y funcional en los vertebrados. Estudios genómicos y funcionales han permitido identificar proteínas análogas en filos como Urocordados, Equinodermos y Cnidarios, lo que pone de manifiesto la ubicuidad y antigüedad de este sistema en el reino animal (Zhu *et al.*, 2005).

En la actualidad se conoce la importancia y la participación de este sistema en múltiples procesos (Law & Reid, 1995):

- Defensa inmediata frente a infecciones:
 - Eliminación de patógenos mediante lisis directa mediada por complemento o potenciando otros mecanismos como la opsonización y fagocitosis.
 - Reclutamiento y activación de fagocitos en el lugar de la infección.
- Función reguladora de la respuesta inmune adquirida:
 - Incremento en la respuesta inmune mediada por anticuerpos (regulación de la producción de anticuerpos).
 - Participación en el establecimiento de la memoria inmunológica (promoviendo la proliferación de linfocitos B y modificando la inmunidad dependiente de linfocitos T).
- Eliminación de inmunocomplejos y restos apoptóticos.

El sistema del complemento lo constituyen más de 30 proteínas presentes en plasma y en superficies celulares. Se encuentra en un equilibrio homeostático donde hay proteínas

reguladoras y activadoras que actúan en función de las necesidades del organismo. La actividad efectora del complemento se localiza en las superficies extrañas y se limita sobre las propias. Si el equilibrio se altera, se puede producir susceptibilidad a infecciones, lesiones en los tejidos, ó estados patológicos crónicos. Hay distintas enfermedades asociadas al complemento, en concreto relacionadas con la vía alternativa destacan: el síndrome hemolítico urémico atípico, la enfermedad por depósitos densos, la nefropatía por IgA, y la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) que es un trastorno ocular que afecta a la visión central.

1.1. Vías de activación

La activación del sistema del complemento se puede llevar a cabo a través de tres vías distintas, estrechamente relacionadas filogenéticamente: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa (Walport *et al.*, 2001a) (Figura 1).

La vía alternativa (VA) está constitutivamente activa a baja intensidad, favoreciendo una rápida amplificación de la respuesta tras una infección por patógenos. Que se active una vía u otra depende del tipo de molécula activadora, pero siempre de forma secuencial. La activación del sistema del complemento por cualquiera de las tres vías conduce a la formación de complejos multiproteicos inestables con actividad serín-proteasa que se denominan C3-convertasas. De esta forma se desencadena una cascada bioquímica donde la señal inicial se amplifica, al generarse en cada paso un gran número de moléculas activadoras del siguiente paso. Tras esta primera etapa de activación tiene lugar una segunda etapa en la que se generan los complejos: C5-convertasas, para terminar en la tercera etapa o fase lítica, donde todas las vías confluyen en la formación del denominado Complejo de Ataque a la Membrana (MAC), que causa lisis celular formando un poro en la superficie del patógeno (Arlaud *et al.*, 2002).

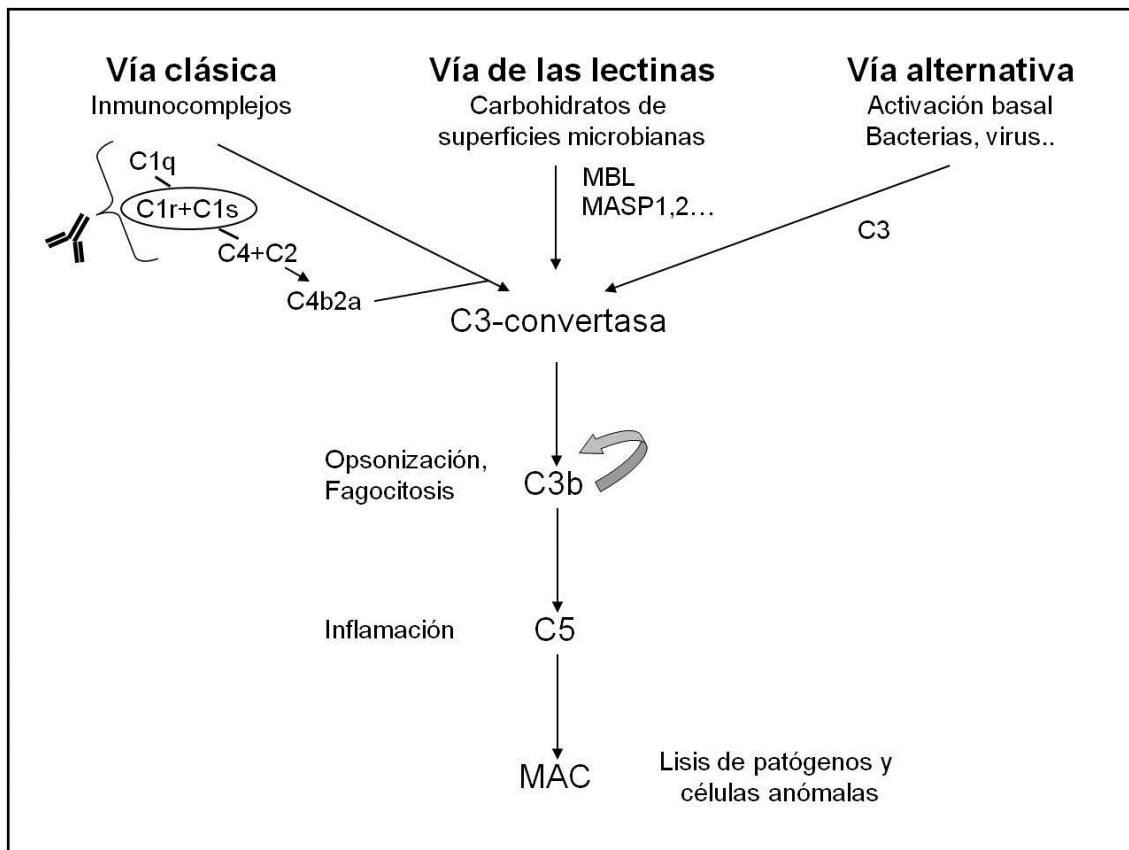


Figura 1. Vías de activación del Complemento. Se representan las tres vías de activación: vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa, que convergen en la activación del componente C3. Esta activación conduce a diferentes funciones en la respuesta inmune, además de a la lisis de patógenos y células anómalas.

Vía Clásica: fue la primera vía que se descubrió. Se activa principalmente a través de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) de IgM y algunos isotipos de IgG. Estos complejos los reconoce el complejo multimolecular C1, formado por una proteína globular llamada C1q y dos proenzimas: dos moléculas de C1r y dos moléculas de C1s. Dicho complejo, se une a la región Fc de las inmunoglobulinas presentes en los inmunocomplejos y sufre un cambio conformacional que induce la activación autocatalítica de C1r que a su vez activa C1s. Después, C1s hidrolizará a los componentes C4 y C2, generando los fragmentos que constituyen el complejo C4b2a, ó C3-convertasa de la vía clásica. Las etapas iniciales de la vía clásica tienen un control adicional por parte del C1 Inhibidor (C1-Inh) que actúa como regulador, ya que los complejos Ag-Ac están formándose constantemente en la circulación (Ricklin *et al.*, 2010).

Vía de las lectinas: esta vía utiliza la capacidad de la proteína MBL (*Mannose Binding Lectin*) y determinadas ficolinas (que son lectinas oligoméricas; Ficolin-1, -2, -3) de unirse a un amplio espectro de hidratos de carbono (manosa, glucosa, L-fucosa, N-acetilglucosamina y otros) que están presentes con mucha frecuencia en las superficies celulares de diferentes microorganismos. La unión de ambos componentes produce la activación en plasma de serín-proteasas (MASP1, MASP2, MASP3 y MAP19), que ejercen una función homóloga a C1r y C1s de la vía clásica, hidrolizando C4 y C2, y generando la misma C3-convertasa de la vía clásica (C4b2a) (Ricklin *et al.*, 2010).

Vía alternativa: esta vía, que filogenéticamente es la más primitiva, permanece constitutivamente activa a baja intensidad, debido a la hidrólisis espontánea del componente C3 a C3(H₂O), que tiene una conformación diferente que le permite unirse al componente factor B (fB) y generar una C3-convertasa de iniciación, C3(H₂O)Bb. Esta C3-convertasa inicial, produce un pequeño número de moléculas de C3b que a su vez pueden originar una C3-convertasa de amplificación, C3bBb, estabilizada por el componente properdina (Figura 2). La C3-convertasa de amplificación es mucho más activa y permite una producción exponencial de C3b que asegura una rápida amplificación de la respuesta de la vía alternativa del complemento tras una infección por patógenos. Este bucle de retroalimentación de la VA, no obstante, debe ser cuidadosamente controlado, como veremos más adelante.

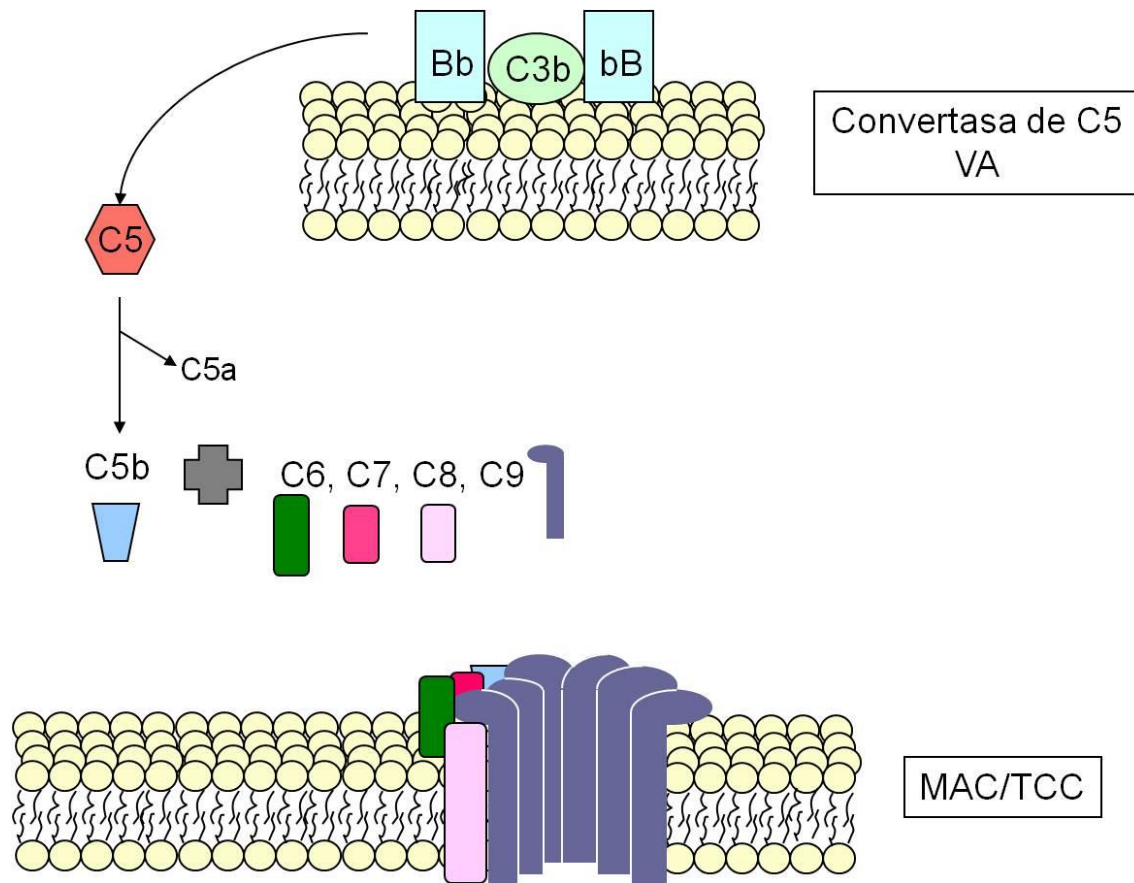


Figura 3. Generación del MAC/TCC. Esquema representativo de la generación del Complejo de Ataque a la Membrana (MAC), durante la fase terminal de la cascada del complemento.

1.2. Control del sistema del complemento. Los reguladores del RCA

La cascada del complemento es la columna vertebral de la inmunidad innata, y requiere un delicado y complejo equilibrio entre la continua activación necesaria para la destrucción de los patógenos y la regulación para asegurar la homeostasis y protección autóloga. Una alteración en el equilibrio entre la activación y el control del complemento puede resultar en un daño ó enfermedad en el huésped pudiendo dañar los tejidos propios. Para que este equilibrio se mantenga, existe una regulación controlada por una serie de proteínas inhibidoras que se encuentran distribuidas en plasma o en las superficies celulares actuando a distintos niveles (Figura 4). No obstante, el punto de máximo control es en el que convergen las 3 vías de activación del complemento: la formación y la actividad de la C3-convertasa (Alcorlo *et al.*, 2015).

Las proteínas implicadas en la regulación de las C3 y C5-convertasas están codificadas en un agrupamiento génico denominado RCA (*Regulator of Complement Activation*) en el cromosoma 1q32 (Rodríguez de Córdoba *et al.*, 1999) (Figura 6). Las proteínas del RCA están compuestas por dominios estructurales, conocidos como *Short Consensus Repeats* (SCRs) que se caracterizan por un alto grado de conservación. Cada SCR está compuesto por aproximadamente 60 aminoácidos (Barlow *et al.*, 1993; Alcorlo *et al.*, 2015). Incluyen 4 cisteínas y algunos aminoácidos hidrofóbicos, tiene una estructura secundaria de láminas beta y su estructura tridimensional está mantenida por 2 enlaces disulfuro. Algunas son proteínas de membrana (MCP, CR1, DAF), que inhiben la activación del complemento sobre las superficies celulares propias. De esta forma, el complemento se activa de manera selectiva sobre los patógenos, ya que estos no expresan estas moléculas. Otras son proteínas plasmáticas (factor H, C4bp), cuyo papel es el de inhibir la activación y el consumo del complemento en fase fluida. Además, factor H (fH) tiene la capacidad de interaccionar selectivamente con las superficies celulares del huésped, protegiéndolas del daño que puede ocasionar la activación del complemento, por lo que también es un regulador de superficie (Fearon, 1978). La función reguladora de estos componentes del RCA es una característica común entre ellos.

1.2.1. Regulación de la C3-convertasa de la vía alternativa

La regulación de la C3-convertasa de la vía alternativa (C3bBb) es crítica ya que va a definir el equilibrio entre activación e inhibición de esta vía. Los reguladores actúan tanto en fase fluida como sobre las superficies celulares, y su acción combinada será determinante para el progreso de la reacción de amplificación de la vía alternativa, que no se producirá en presencia de los reguladores. Cualquier alteración a este nivel puede generar una situación patológica, como en el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU).

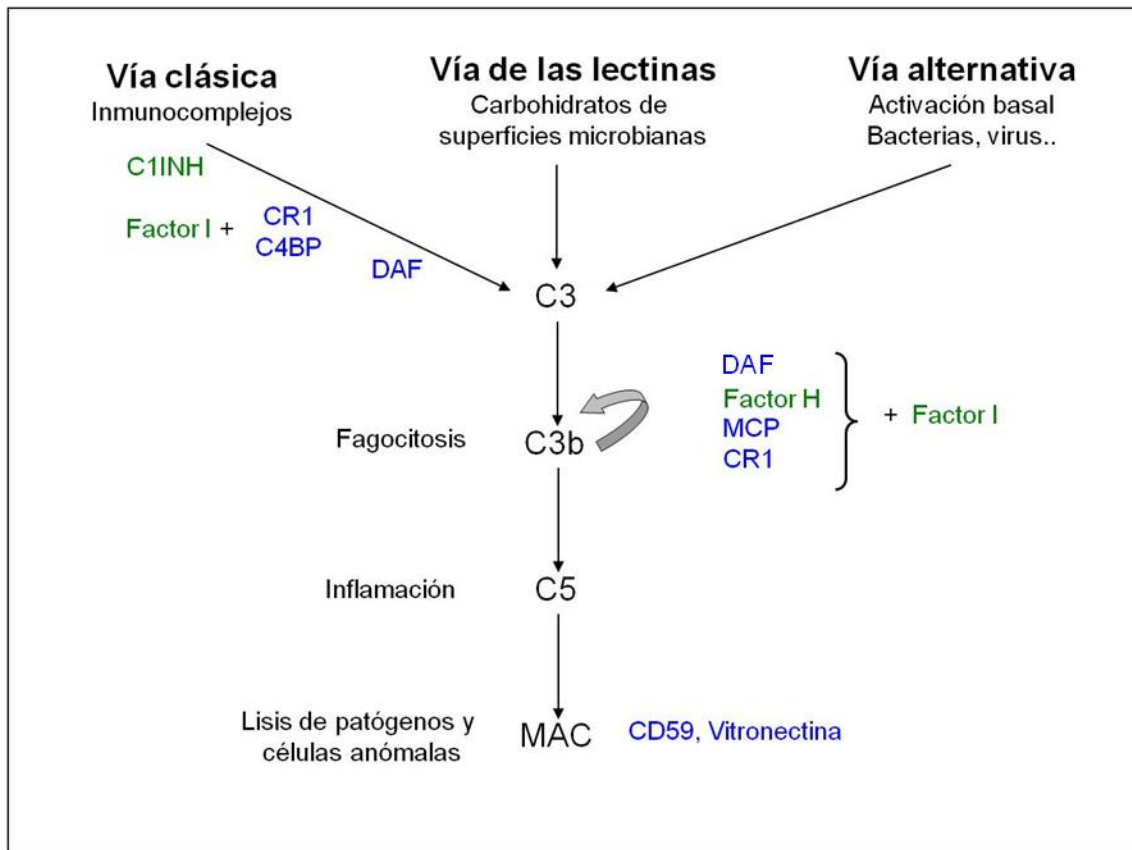


Figura 4. Regulación de las vías de activación del Complemento. Esquema de las vías del Complemento dónde en color azul se muestran los reguladores que son proteínas de membrana, y en verde los reguladores que son proteínas solubles.

1.2.2. Disociación de la C3-convertasa de la vía alternativa

Las C3-convertasas son complejos proteicos de naturaleza inestable, y una vez formadas tienden a disociarse/decaer espontáneamente. Cuando se disocia la C3-convertasa de la vía alternativa (C3bBb), la actividad enzimática del componente catalítico Bb se pierde, ya que no puede reasociarse, en cambio el C3b sí puede volver a formar nuevos complejos C3-convertasas. La disociación de la C3-convertasa puede acelerarse por proteínas del RCA (fH, DAF y CR1), que actúan tanto sobre las superficies celulares (DAF, CR1) como en fase fluida (fH). Se piensa que el mecanismo de regulación de la disociación proviene de interacciones con C3b y Bb (Lambris *et al.* 1996; Oran & Isenman, 1999), aunque aún no se conoce con exactitud. También se sugiere que cada regulador tiene un mecanismo de disociación diferente (Harris *et al.*, 2005).

1.2.3. Proteólisis de C3b

Las moléculas de C3b pueden ser inactivadas proteolíticamente por la proteína reguladora Factor I (fI). Factor I es una serín proteasa (88 kDa) que circula en plasma de forma activa. Está compuesto por una cadena ligera (37 kDa) y una pesada (51 kDa) (Catterall *et al.*, 1987). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de activación, se sabe que Factor I, es muy específico y que sólo corta al C3b en presencia de alguna proteína del RCA que actúe como cofactor (Law & Reid, 1995). C3b (181 kDa) está compuesto por una cadena alfa y una cadena beta unidas por enlaces disulfuro. En una primera etapa, fI junto con cofactores como MCP, CR1 y fH produce dos cortes en la cadena alfa, generando un C3b inactivo (iC3b) de 155 kDa que es incapaz de formar nuevos complejos de C3-convertasa, y liberando un péptido (C3f) de 17 aminoácidos. Si el cofactor es CR1, fI produce un segundo corte que libera otro fragmento (C3dg) de 25 kDa. Los distintos fragmentos generados se unirán a algunos receptores del complemento y mediarán funciones como la eliminación de inmunocomplejos, opsonización, la estimulación de linfocitos B y la memoria inmunológica.

1.3. Factor H y proteínas FHRs

fH es una glicoproteína plasmática de 150 kDa que actúa como principal regulador de la activación del complemento en plasma y en superficies celulares (Ferreira *et al.*, 2006; Józsi *et al.*, 2015). Es una proteína compuesta por 20 dominios SCRs, que se sintetiza de forma constitutiva por el hígado, aunque puede expresarse en diferentes tejidos como plaquetas, leucocitos de sangre periférica (PBLs), membranas endoteliales y epiteliales, epitelio pigmentario retinal ó células madres mesenquimales entre otros (Ferreira *et al.*, 2010). Su concentración plasmática varía entre 116 y 562 µg/mL y está condicionada por factores ambientales y genéticos, estos últimos estimados en un 62% (Esparza-Gordillo *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 1982).

La actividad reguladora de fH en el complemento se debe a la inhibición de la C3-convertasa de la vía alternativa mediante los siguientes mecanismos:

- a) Competir en plasma y en membranas celulares con factor B por la unión a C3b, impidiendo la formación del complejo pro-C3-convertasa de la vía alternativa.
- b) Acelerar la disociación de la C3-convertasa de la vía alternativa.

- c) Actuar como cofactor de factor I en la degradación proteolítica de C3b (Pangburn *et al.*, 1977; Weiller *et al.*, 1976; Whaley & Ruddy, 1976).

Aunque fH es una proteína plasmática, también es capaz de regular la activación del complemento sobre superficies celulares debido a su capacidad de unirse a polianiones, como el ácido siálico, y glucosaminoglicanos (GAGs). La presencia de estos marcadores en superficies celulares propias aumenta la afinidad de fH por el C3b depositado en esas superficies, por el reconocimiento simultáneo de ambos tipos de moléculas. De esta forma, fH actúa selectivamente, impidiendo la activación de la cascada del complemento sobre superficies celulares propias y permitiendo la activación sobre superficies extrañas.

1.3.1. Dominios funcionales de factor H

Se han identificado y caracterizado distintas regiones de fH que participan en la interacción con C3b y polianiones mediante ensayos funcionales, empleando tanto fH completo, como fragmentos recombinantes, estableciendo un mapa de la proteína (Pangburn *et al.*, 1983). Factor H tiene tres sitios donde se puede unir C3b; uno se localiza en los dominios SCR1-4, donde radica la capacidad cofactora de la molécula tanto en fase fluida como en superficies celulares. Los otros dos sitios de unión de C3b se localizan en el dominio SCR7 y en los dominios SCRs 19-20, donde además se produce la interacción de fH con polianiones y GAGs. La molécula de fH es flexible y los extremos N y C-terminal están próximos entre sí (Perkins *et al.*, 2002) (Figura 5).

Actividad cofactora de FI
Aceleración de la disociación de la C3-convertasa

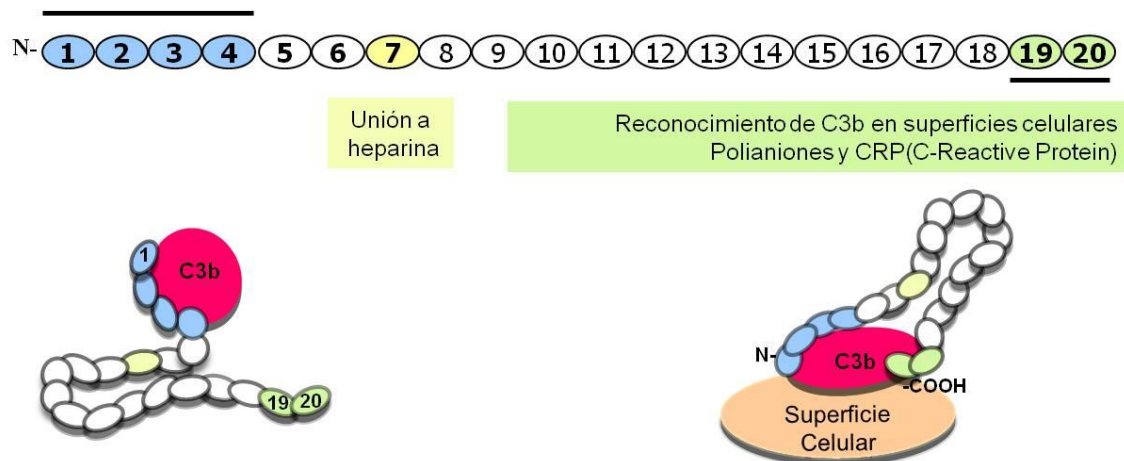


Figura 5. Dominios funcionales de fH. Los dominios SCR de fH se representan con círculos. Se muestran los sitios de unión a C3b, a CRP y a polianiones (polisacáridos sulfatados como la heparina y ácido siálico).

1.3.2. Proteínas FHRs

El gen que codifica factor H se denomina *CFH* y se encuentra en la región RCA del cromosoma 1q32. *CFH* se extiende 95 Kb y está compuesto por 23 exones (Pérez-Caballero *et al.*, 2001). Además, por procesamiento alternativo, puede dar lugar a otra proteína conocida como factor H-like 1 (FHL-1). FHL-1 está formada por los 7 primeros dominios SCR de factor H y una cola hidrofóbica de 4 aminoácidos (SFTL) que no está presente en factor H, y que está codificada por un exón adicional (Zipfel *et al.*, 1994). Adyacentes al gen *CFH* hay 5 genes más que codifican unas proteínas plasmáticas que muestran reactividad antigénica cruzada con fH y que se conocen como proteínas relacionadas con factor H (*Factor H-Related*; FHR) (Skerka *et al.*, 2013). El orden 5'-3' de los genes es: *CFH*, *CFHR3*, *CFHR1*, *CFHR4*, *CFHR2* y *CFHR5* (Figura 6).

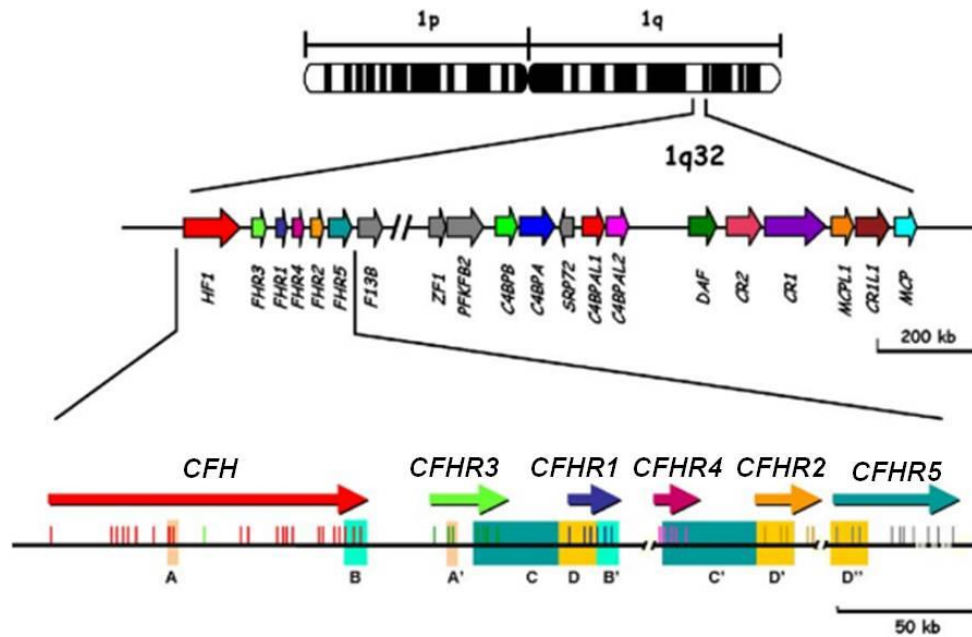


Figura 6. Estructura del agrupamiento génico RCA. El agrupamiento génico RCA se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1, en la región 1q32. Se muestra también la subregión de los genes de factor H y de las proteínas FHRs (Rodríguez de Córdoba *et al.*, 1999).

La proteína FHR-1 tiene dos isoformas (FHR-1 α , FHR-1 β) con distinto grado de glicosilación. FHR-2 presenta también dos isoformas, FHR-2 sin glicosilar y FHR-2 α glicosilada (Skerka *et al.*, 1992). FHR-3 presenta varias isoformas con diferente grado de glicosilación (Hellwage *et al.* 1999). El gen *CFHR4* codifica dos proteínas, FHR-4A y FHR-4B, que surgen de un procesamiento alternativo (Jozsi *et al.* 2005).

Las proteínas FHRs tienen una historia evolutiva común, ya que son homólogos tanto en secuencia como estructuralmente a fH. Sus genes comparten varias regiones exón-intrón duplicadas que explican la similitud secuencial y estructural, integrando la llamada familia de proteínas fH/FHRs. Los dominios SCR de las proteínas FHRs muestran un grado de identidad con los SCRs de fH muy variable, desde el 32% hasta el 100% a nivel de aminoácido (Figura 7).

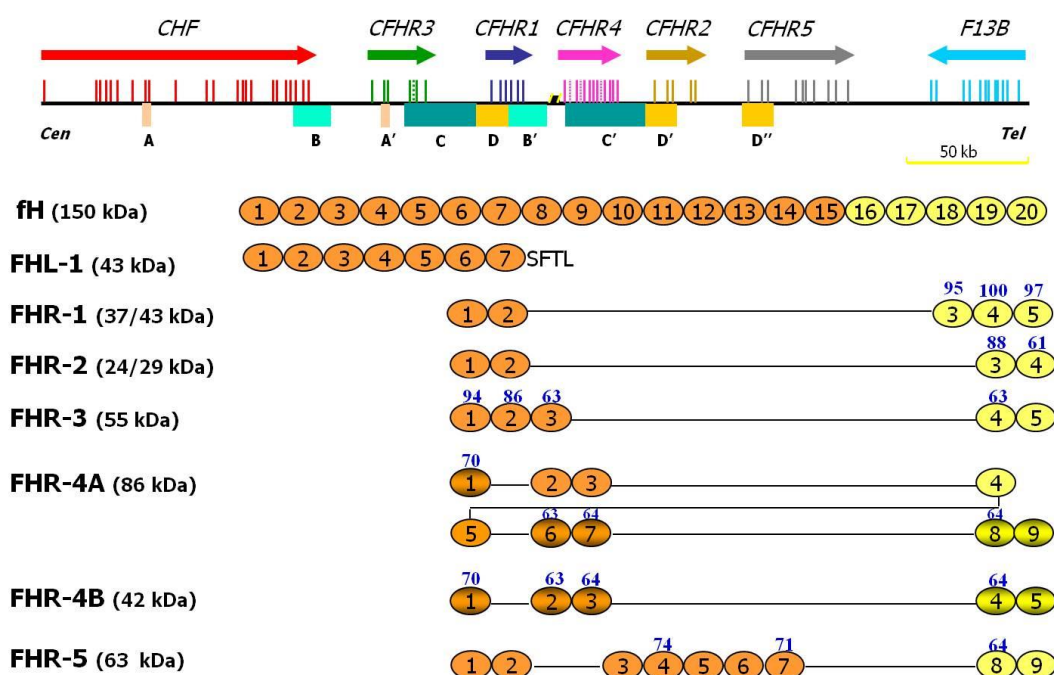


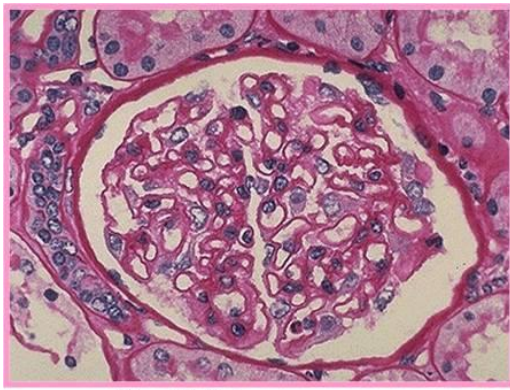
Figura 7. Homología de las proteínas FHRs con fH. En la parte superior, se representa la subregión del agrupamiento génico RCA que contiene el gen *CFH* y los genes *CFHR1-5*. Se muestra la localización de varias regiones duplicadas (A-D) de longitud variable, que incluyen diversos exones de estos genes y que han originado la familia de factor H. En la parte inferior de la figura se muestra la composición en dominios SCR de todos los miembros de la familia de factor H. Los números encima de los dominios SCR representan el porcentaje de aminoácidos idénticos entre esos dominios y el dominio homólogo en factor H. Figura basada en datos de Rodríguez de Córdoba *et al.* 2004 (Figura 3 y Tabla 1) y Jozsi *et al.* 2006 (Tabla 1 y Figura 3b).

Aunque se desconoce la función específica de las proteínas FHRs, cabe destacar que ninguna de ellas tiene dominios homólogos con la región N-terminal de fH (Skerka *et al.*, 2013), por lo que no podrían tener una función reguladora similar a fH. Sin embargo, debido a la homología secuencial y a la presencia de dominios SCR conservados, se ha propuesto que las proteínas FHRs pueden modular y/o interferir con la función de fH, compitiendo por ligandos y superficies, y cooperar así en la regulación de la activación del complemento. También es posible que cada proteína tenga funciones específicas e independientes de las de fH. Las proteínas FHRs se han identificado en diferentes especies (hombre, rata, ratón, chimpancé...), y esta conservación evolutiva sugiere que dichas proteínas tienen relevancia fisiológica.

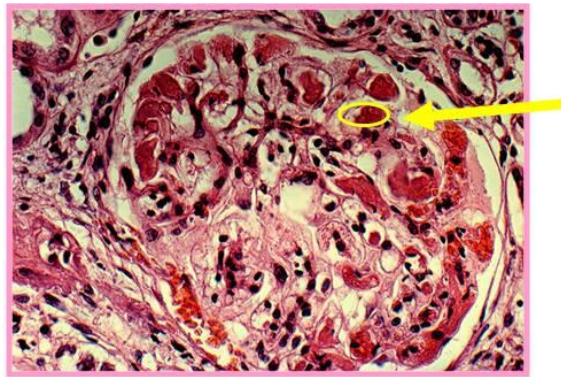
Muy probablemente los genes *CFH/CFHRs* se originaron mediante sucesivos procesos de duplicación génica en la región RCA. La presencia de estas regiones intrón-exón duplicadas en los genes *CFH/CFHRs* sigue siendo una fuente potencial de variación genética adicional, mediante mecanismos de recombinación homóloga desigual ó conversión génica. Estas regiones duplicadas pueden recombinarse total o parcialmente, provocando la inserción o eliminación de algunos exones o incluso de genes completos. En concreto, se han descrito 2 genes híbridos *CFH:CFHR1* y 2 genes híbridos *CFHR1:CFH*. Todos están incluidos en la Figura 3 del artículo *Atypical aHUS: State of the art* (Nester *et al.*, 2015). Además, diferentes reordenamientos génicos en la región *CFH/CFHR1-5* han dado lugar a la delección de los genes *CFHR1* y *CFHR3* (Hughes *et al.*, 2006), y a la generación de un gen híbrido *CFH:CFHR1* (Venables *et al.*, 2006) y *CFH:CFHR3* (Francis *et al.*, 2012). Estos reordenamientos normalmente tienen repercusiones patológicas, asociándose a enfermedades como SHUa (Síndrome Hemolítico Urémico atípico), GN (Glomerulonefritis), IgAN (Nefropatía por IgA) ó DMAE (Degeneración Macular asociada a la Edad). Así, las proteínas de la familia de factor H (proteínas FHRs) podrían estar implicadas en la predisposición al SHUa. Tal como se ha visto, existe un elevado grado de similitud entre el gen de factor H y los genes *CFHR1-5*, y, algunas de estas proteínas FHRs contienen dominios casi idénticos a otros dominios de factor H.

2. EL SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO (SHU)

El Síndrome Hemolítico Urémico (SHU) descrito por Gasser *et al.* (1955), se presenta clínicamente con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo (Campistol *et al.*, 2015; Nester *et al.*, 2015). Es una microangiopatía trombótica (MAT) ocasionada por daño endotelial en la microvasculatura glomerular, que se manifiesta con engrosamiento de la pared vascular, inflamación del endotelio y desprendimiento de la membrana basal glomerular. Este daño endotelial dispara una cascada de procesos que dan como resultado la formación de microtrombos de plaquetas y fibrina, que ocluyen las arteriolas y los capilares renales. La rotura de los eritrocitos que atraviesan esta microvasculatura parcialmente ocluida genera esquistocitos (fragmentos celulares) y es característica del SHU (Figura 8).



Individuo sano



Enfermo de SHU
Lesión glomerular (MAT)

Figura 8. Lesiones glomerulares de microangiopatía trombótica. Se muestran cortes histológicos de un glomérulo. En la parte izquierda se observa un glomérulo de un individuo sano, y en la parte derecha, un glomérulo de un enfermo de SHU. Las imágenes han sido obtenidas de las siguientes páginas web:

- Glomérulo sano: <http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL080.html>
- Glomérulo enfermo: http://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_16/c16_s8d.htm

La mayoría de los casos de SHU resultan de la presencia de la toxina Shiga, producida por bacterias, especialmente *E.coli* O157:H7. Esta presentación se conoce como SHU típico, que afecta principalmente a niños y generalmente tiene buen pronóstico, con recuperación hematológica y renal completa en pocas semanas. En un 5-10% de casos, sin embargo, el SHU no está causado directamente por toxinas bacterianas. Esta forma atípica (SHUa) es una enfermedad ultra-rara, con una prevalencia aproximada de 1/1.000.000. El SHUa se presenta tanto en niños como en adultos y tiene mal pronóstico, con tasas de mortalidad ó insuficiencia renal terminal (IRT) de 10%-25% en el debut y un 50% de IRT a largo plazo en los supervivientes. SHUa es una enfermedad multifactorial donde influyen factores ambientales y factores genéticos. Se piensa que las infecciones, los fármacos inmunosupresores, las drogas anti-tumorales, los anticonceptivos orales, el embarazo ó el postparto podrían iniciar la cascada patogénica que da lugar a SHUa en los individuos genéticamente susceptibles (Nester *et al.*, 2015). Se considera SHUa primario cuando la microangiopatía trombótica está asociada con desregulación del complemento, pero cuando el SHUa se produce como consecuencia de un desencadenante como los inmunosupresores, anticonceptivos orales y otros fármacos se le considera secundario.

2.1. Predisposición genética a SHUa

En SHUa el principal mecanismo patogénico es la desregulación de la vía alternativa del Complemento en la superficie de la microvasculatura renal y se asocia con frecuencia a mutaciones y polimorfismos en genes del sistema del complemento (Sánchez-Corral y Melgosa, 2010). Aproximadamente un 50% de los pacientes de SHUa tienen mutaciones o autoanticuerpos que alteran el funcionamiento de la vía alternativa del sistema del complemento, amplificando el daño endotelial inicial y favoreciendo el desarrollo de SHUa. Así, el 44% de 795 pacientes con SHUa de cuatro cohortes europeas presentan mutaciones solas o combinadas en los genes de Factor H (*CFH*), la proteína cofactora de membrana o *Membrane Cofactor Protein* (*MCP*), factor I (*CFI*), C3 y Factor B (*CFB*) (Bresin *et al.*, 2013). Además, hay dos genes que no corresponden al complemento y que pueden estar también mutados en algunos pacientes, como el gen de la trombomodulina (*THBD*), que es un cofactor de la trombina, y el de la diacilglicerolquinasa epsilon (*DGKE*), que es una enzima que cataliza la conversión del diacilglicerol a ácido fosfatídico. Alteraciones en estas proteínas dan lugar a procesos protrombóticos característicos del SHUa (Sánchez Chinchilla *et al.*, 2014, Rodríguez de Córdoba *et al.*, 2014).

En pacientes de SHUa, las mutaciones más frecuentes son en fH y están localizadas en la región C-terminal, reduciendo así su capacidad para controlar la activación del complemento en superficies y aumentando el daño autólogo por complemento. Por este motivo, los pacientes con estas mutaciones tienen muy mal pronóstico, y muchos de ellos mueren o desarrollan IRT durante el debut de la enfermedad y hay una alta recurrencia después de un trasplante renal.

Aproximadamente un 40-60% de los pacientes con SHUa son portadores de mutaciones puntuales en heterocigosis en genes del complemento, causando desregulación de la vía alternativa del complemento. Dicha desregulación puede producirse tanto por una disminución en la actividad de las proteínas reguladoras como por una actividad anormalmente elevada de las C3-convertasas. Así, mientras que las mutaciones en factor H, MCP y factor I reducen la eficacia de la función reguladora de estas proteínas, las mutaciones en factor B o en C3 son mutaciones de “ganancia de función” que dan como resultado una C3-convertasa más activa. También es importante señalar que factor H, factor I, factor B y C3 son proteínas plasmáticas sintetizadas fundamentalmente por

el hígado, mientras que MCP se localiza en las superficies celulares. Estas características poseen importantes implicaciones en la aplicación de tratamientos con plasma y en el trasplante renal en los pacientes con SHUa (Nester, *et al.*, 2015; Campistol *et al.*, 2015).

La mayoría de las mutaciones en SHUa se presentan en heterocigosis, con penetrancia incompleta. Algunos estudios señalan una penetrancia en torno al ~50% en los portadores de mutaciones, y se han descrito también variantes genéticas en *CFH*, *MCP* y *CFHR1* que co-predisponen a la enfermedad. De hecho, el haplotipo *CFH**tggtgt* (conocido como *CFH*(*H3*)) y el haplotipo *MCP**ggaac* han mostrado que aumentan la penetrancia de SHUa en los portadores de mutaciones en genes del complemento (Bresin *et al.*, 2013). El efecto del alelo *CFHR1***B* en la penetrancia del SHUa aún no se ha determinado. Como se ha mencionado, los genes *CFH*, *CFHR1* y *MCP* están localizados en la región RCA del cromosoma humano 1q32. *CFH* y *CFHR1* están separados por sólo 72.25 kb, por lo que existe la posibilidad de que las variantes de riesgo de *CFH*(*H3*) y *CFHR1***B* estén en desequilibrio de ligamiento. En este sentido, un estudio realizado en un pequeño número de pacientes de SHUa señala que todos los cromosomas con el haplotipo *CFH*(*H3*) también llevan el alelo *CFHR1***B* (Sansbury *et al.*, 2014).

2.2. Tratamiento del SHUa

La terapia con plasma, ya sea mediante intercambio plasmático ó por infusión, ha sido la piedra angular en el tratamiento del SHUa desde 1980, y la única disponible hasta hace poco. La efectividad de la terapia con plasma se cree que está relacionada con la capacidad de proporcionar niveles normales de fH, fI, fB y C3 y cuando el plasma se intercambia por aféresis se eliminan además proteínas mutadas de fH, fI, fB, C3 y autoanticuerpos anti-fH. Los datos registrados sugieren que la terapia de plasma es efectiva para alcanzar una remisión hematológica en al menos un 70% de los casos. El intercambio plasmático es preferible cuando hay proteínas anómalas compitiendo posiblemente con las proteínas nativas, y la infusión de plasma se acepta como alternativa al intercambio plasmático si existe únicamente una deficiencia de proteína. Los pacientes de SHUa con mutaciones en MCP no responden a la terapia con plasma, ya que MCP no es una proteína plasmática (Caprioli *et al.*, 2006).

La activación de la vía terminal del complemento es esencial para el desarrollo de las lesiones endoteliales que caracterizan el SHUa. Afortunadamente, el pronóstico de los pacientes con SHUa ha mejorado desde la introducción del inhibidor del complemento “Eculizumab”. Eculizumab es una inmunoglobulina recombinante, humanizada y monoclonal que se dirige al C5 y bloquea la generación de C5a y C5b, previniendo la generación del péptido proinflamatorio C5a y del complejo de ataque a la membrana C5b-9. El Eculizumab, se utilizó inicialmente para la Hemoglobinuria paroxística nocturna y fué aprobado por la EMA y la FDA en Septiembre de 2011 para el tratamiento de SHUa, después de los satisfactorios ensayos clínicos en adultos y adolescentes (Legendre *et al.*, 2013). El mayor inconveniente del tratamiento con Eculizumab es el riesgo de infección por organismos bacterianos encapsulados, particularmente *Neisseria meningitidis*, por el bloqueo de la vía lítica del complemento. Por ello, los pacientes deben recibir vacunación frente a diversos microorganismos antes de ser tratados con Eculizumab. Actualmente, se recomienda Eculizumab en el debut del SHUa, pero su uso a largo plazo es cuestionable. Se ha propuesto el intercambio plasmático como una primera terapia razonable, y el Eculizumab si no hay respuesta al plasma. En función de los resultados de los estudios genéticos, se puede elaborar un plan a largo plazo para la terapia de plasma y el uso de Eculizumab basado en la seguridad, eficacia y coste/beneficio (Nester, *et al.*, 2015; Campistol *et al.*, 2015).

2.3. Autoanticuerpos anti-fH

Los autoanticuerpos anti-fH se describieron en 2005 (Dragon-Durey *et al.*, 2005) y se presentan principalmente en niños entre 0 y 10 años. La frecuencia de estos autoanticuerpos es del 6%-11% de los casos pediátricos, aunque también se han observado en un número pequeño de casos adultos. Esta forma autoinmune de SHUa está altamente ligada a la delección *CFHR3-CFHR1* en homocigosis, pero la causa por la que el 90% de los pacientes que tienen autoanticuerpos anti-fH circulantes presentan deficiencia de FHR-1 y FHR-3 no se comprende aún. La mayoría de los anticuerpos anti-fH reconocen y bloquean funcionalmente el dominio SCR20 de fH (Blanc *et al.*, 2015) y muestran crossreactividad in vitro/in vivo con el dominio SCR5 de FHR-1 debido a la homología de la secuencia (Strobel *et al.*, 2011). Algunos autoanticuerpos anti-fH también reconocen FHR-2 (Blanc *et al.*, 2012). Deficiencias aisladas de FHR-1 o FHR-3, así como la deficiencia combinada de FHR-1 y FHR-4, también se han

descrito en algunos pacientes (Abarategui-Garrido *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010). Los pacientes con anticuerpos anti-fH sufren numerosas recidivas, especialmente en los dos primeros años después del debut de la enfermedad, con progresión a insuficiencia renal terminal (IRT) en un 20-35% de los casos y una tasa de mortalidad del 10% (Blanc *et al.*, 2012). La terapia para los autoanticuerpos anti-fH en SHUa no está clara, pero el objetivo es normalizar la regulación de la vía alternativa. Normalmente, para eliminar los autoanticuerpos la primera estrategia es hacer un intercambio de plasma utilizando plasma fresco congelado, pero además se recomiendan tratamientos inmunosupresores para evitar la generación de autoanticuerpos (Khandelwal *et al.*, 2015). Las características sobre los datos clínicos y biológicos de estos pacientes están disponibles en distintos informes clínicos, series de casos y dos grandes cohortes. Sin embargo, faltan aún datos más concluyentes y ensayos prospectivos para determinar el tratamiento óptimo (Hofer *et al.*, 2014) y profundizar en el conocimiento de estos autoanticuerpos.

OBJETIVOS

1. Analizar la frecuencia de mutaciones, variantes genéticas de riesgo y autoanticuerpos anti-factor H en la cohorte española de SHUa.
2. Identificar nuevas variantes genéticas de riesgo a SHUa en la región *CFH-CFHR3-CFHR1* y determinar si segregan en un mismo haplotipo.
3. Identificar formas anómalas de factor H y las proteínas FHRs en pacientes de SHUa mediante *Western-blot* y caracterizar una proteína híbrida FHR-3:FHR-4.
4. Caracterizar los autoanticuerpos anti-fH en muestras seriadas de pacientes de SHUa para determinar si varían a lo largo del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE PACIENTES Y CONTROLES

En esta Tesis se muestran resultados de estudios realizados en pacientes de SHU atípico (SHUa, n=367), SHU típico (SHUt, n=43), glomerulopatía de C3 (C3G, n=32), y nefropatía por IgA (IgAN, n=80). Los pacientes fueron informados previamente por su médico, y firmaron el correspondiente Consentimiento Informado, aprobado por los Comités Éticos del Hospital Universitario La Paz ó el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Se utilizaron también un total de 92 voluntarios españoles sanos como controles.

Para los diferentes estudios se solicitaron muestras de sangre periférica (25 mL a pacientes adultos y 5 mL a niños), incluyendo sangre-EDTA y sangre sin anticoagulante. En los pacientes de SHUa se obtuvieron muestras de sangre en el debut y/o en las recidivas.

Las muestras de sangre se emplearon para obtener suero y plasma, que se almacenaron a -20°C y a -80°C hasta su uso. La muestra de sangre-EDTA se utilizó también para preparar ADN genómico a partir de los leucocitos de sangre periférica (Peripheral-blood leukocytes [PBLs]) por procedimientos estándar.

2. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

2. 1. Muestras de Sangre-EDTA

1) Se separaron 500 µL de la muestra de sangre-EDTA y se emplearon para hacer citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de MCP y DAF (CD46 y CD55, respectivamente) en el mismo día de la llegada de la muestra. En este análisis se incluyó una muestra de sangre-EDTA de un individuo sano extraída el mismo día que la muestra del paciente (Control 1) y otra muestra control extraída el día en que se realiza el estudio de citometría (Control 2). Estos análisis se realizaron en el servicio de Inmunología del Hospital La Paz bajo la dirección de la Dra. Margarita Lopez-Trascasa.

2) El resto de la sangre-EDTA se centrifugó (2.500 rpm, 15 minutos), se separó el plasma EDTA y se guardaron alícuotas a -20 °C y a -80 °C para su mejor conservación.

3) El tubo original de sangre-EDTA se empleó para la preparación de ADN (ver protocolo apartado 3. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica) de PBLs. Con el ADN obtenido se realizaron análisis genéticos para identificar mutaciones

y polimorfismos en los genes que codifican factor H, factor I, MCP, C3 y factor B mediante PCR y posterior secuenciación Sanger automática. Se analizó también el número de copias en la región *CFHR3-CFHR5*, mediante la técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) con el fin de identificar posibles deleciones o duplicaciones. Estos análisis se realizaron en el laboratorio del Profesor Santiago Rodríguez de Córdoba del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, con el que nuestro grupo colabora en el estudio de las bases moleculares del SHUa.

2.2. Muestras de Suero

- 1) Una alícuota de suero (300 µL) recién obtenido se empleó para determinar los niveles de C3, C4 e IgG mediante nefelometría, el mismo día de la recepción de la muestra.
- 2) Otra alícuota de suero se guardó a -20 °C para posteriormente: (a) Cuantificar factor H y factor I mediante ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*); y (b) Analizar la presencia de autoanticuerpos anti-fH mediante ELISA.
- 3) Una tercera alícuota de suero se guardó a -80 °C, para utilizarla en ensayos hemolíticos del complemento.

Estos análisis se realizaron en el servicio de Inmunología del Hospital La Paz bajo la dirección de la Dra. Margarita López-Trascasa.

2.3. Muestras de Plasma-EDTA

- 1) Una alícuota de 500 µL se almacenó a -20 °C para posteriormente analizar factor H y las proteínas FHRs mediante *Western-blot*. Estos análisis permiten identificar muestras que tienen deficiencia de una o varias proteínas, así como muestras con proteínas anómalas con distinto peso molecular.
- 2) El resto del plasma-EDTA se alicuotó y almacenó a -80 °C. Estas muestras se reservaron para purificación de proteínas y estudios funcionales.

3. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la extracción de DNA genómico se empleó el tubo de la muestra de sangre-EDTA de donde se había separado el plasma y que contenía los PBLs. Con una pipeta *pasteur* se extrajo el halo de leucocitos, transfiriéndose a otro tubo al que se le añadió tampón de

lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM). Se homogeneizó la mezcla suavemente y se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm. Se eliminó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el “pellet” de leucocitos. Se repitió el lavado y la centrifugación con el tampón de lisis de glóbulos rojos, hasta que el sobrenadante fue transparente. A continuación, el “pellet” de leucocitos se resuspendió en tampón de lisis de glóbulos blancos (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, SDS 0,2%), se agitó unos segundos en el vortex y se homogeneizó suavemente hasta obtener una solución fluida. Posteriormente se añadió solución de precipitación de proteínas (Puregene, Gentra), se agitó de nuevo con el fin de obtener una mezcla homogénea, y se centrifugó 10 minutos a 2.500 rpm. Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio al que se le añadió el mismo volumen de isopropanol, y se mezcló suavemente hasta que se formó una "malla" de ADN. El ADN se lavó en etanol al 70%, se dejó secar brevemente y se resuspendió en solución de hidratación de ADN (Puregene, Gentra). La muestra se dejó unos días a temperatura ambiente para facilitar la completa hidratación del ADN. Antes de cuantificarla, la muestra se calentó a 65 °C durante una hora, se dejó a temperatura ambiente unos minutos, y cuando estuvo homogénea se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm.

4. Cuantificación de factor H

Los niveles de factor H se midieron en muestras de plasma-EDTA mediante un ensayo ELISA sándwich casero. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA) con 100 ng de un anticuerpo casero anti- factor H humano generado en conejo y diluido en NaHCO₃ 0.1M, pH 9.5. Después de mantenerlas a 4 °C toda la noche, las placas se lavaron con Tris 50 mM Tris, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 0.2% (Tris-Tween) y posteriormente se bloquearon con BSA 1% en el mismo tampón, incubándolas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de dos diluciones (1:3000, 1:6000) de cada muestra de Plasma-EDTA en la solución de bloqueo, y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. La presencia de factor H se detectó con un anticuerpo monoclonal casero generado en ratón (moAb214) y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Hamburg, Germany). Tras la adición del sustrato de peroxidasa *o*-phenylene-diamine (Kem-En-Tec Diagnostics), se desarrolló una reacción colorimétrica durante unos minutos; la reacción se detuvo con H₂SO₄ 0.1M, y la

densidad óptica se leyó a 492 nm. La concentración de factor H en plasma se calculó comparando con un plasma de referencia con una concentración de factor H conocida. Estos análisis se realizaron en el laboratorio del Profesor Santiago Rodríguez de Córdoba.

5. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-FACTOR H (ANTI-FH)

5.1 Detección de autoanticuerpos anti-fH

La cuantificación de anticuerpos anti-fH se realizó mediante un ensayo ELISA, según se describió previamente (Abarrategui-Garrido *et al.* 2009). Se utilizaron placas de 96 pocillos tapizados con 200 ng de fH purificado o con HSA (como control negativo) e incubados toda la noche a 4 °C. Después de lavar tres veces con PBS-Tween-20 al 0.1%, y bloquear con BSA al 1% en tampón de lavado durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se añadieron diluciones seriadas de las muestras, incubándolas durante una hora a 37 °C. Para detectar los anticuerpos anti-fH unidos, se añadió anti-IgG humana conjugada con peroxidasa durante una hora tras tres lavados, y la reacción enzimática se desarrolló con el sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina) (Thermo Scientific Pierce) (Dragon-Durey *et al.* 2005). Tras varios minutos de incubación, la reacción se paró con H₂SO₄ 0,1 M y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Multiskan RC (ThermoLabsystems). Como referencia se utilizó una muestra con anticuerpos anti-fH proporcionada por la Dra. Marie-Agnès Dragon-Durey (Hôpital Georges Pompidou, Paris, France) con un título de anticuerpos de 200AU/mL. Las muestras por encima de 150AU/mL (media + 2 DS obtenidas de 54 muestras controles) fueron consideradas positivas.

5.2. Caracterización de la subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos

Todos los autoanticuerpos anti-fH identificados eran de la clase IgG. La determinación de las subclases de IgG se realizó mediante ensayos ELISA tapizando los pocillos con fH purificado. Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanos, y de las cadenas ligera kappa y lambda (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary, y Southern-Biotech, AL, USA), además de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa (Dako). El resto del procedimiento se desarrolló de la misma forma que en los ensayos ELISA anteriores.

5.3. Unión de los autoanticuerpos a fragmentos de fH recombinante

Se realizaron ensayos ELISA (placas *Costar High Binding*) añadiendo 25 ng/pocillo de fH purificado o de fragmentos recombinantes de fH (SCRs 1-4, SCR 6-8, SCR 19-20) (Blanc *et al.* 2012; Jokiranta *et al.* 2006). Después de bloquear con PBS-BSA 0,1%, se añadieron los sueros de los pacientes diluidos en H₂O y se incubaron durante una hora a 37 °C. Después de los lavados con PBS-Tween-20 al 0,1%, la IgG unida se midió usando un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). La unión de los autoanticuerpos a FHR-1 recombinante se analizó también en muestras de todos los pacientes.

5.4. Ensayos de inhibición y mapeo del dominio de unión con anticuerpos monoclonales anti-FH

Para caracterizar los dominios de fH reconocidos por los distintos autoanticuerpos, se realizaron ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales comerciales que reconocen distintos dominios de fH. Se tapizaron placas de 96 pocillos con 25 ng/pocillo de fH y se añadieron 20 µg/mL de anticuerpos monoclonales anti-fH con distinta especificidad (A254: SCR1; A255: región central; A229 y VIG8: región C-terminal; IXF9: SCR18; C18: SCR20). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron las muestras de suero de los pacientes con autoanticuerpos anti-fH y se incubaron durante una hora. La unión de los autoanticuerpos se detectó posteriormente usando anti-IgG humana conjugada con peroxidasa.

5.5. Determinación de la avidéz

La avidéz de los autoanticuerpos anti-fH se determinó por ELISA en presencia de NaSCN (Suwannalai *et al.* 2011). Previamente se determinó la dilución más apropiada de cada muestra para asegurar que la unión a fH no estaba en saturación y que el valor de A₄₉₂ estaba en el rango de la curva estándar. Después de una hora de incubación a 20 °C, se lavaron las placas, se añadieron distintas concentraciones de NaSCN (0, 0,25, 0,5, 1, 2, y 5 M), y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para disociar los inmunocomplejos fH:anti-fH. Después de lavar las placas, los autoanticuerpos que permanecieron unidos se detectaron con anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. El índice de avidéz (AI) se calculó como la ratio de la unión

de los autoanticuerpos anti-fH a los pocillos tras la elución con 0,5 M ó 1 M NaSCN, y la unión de los anticuerpos anti-fH en ausencia de NaSCN.

5.6. Inmunocomplejos fH:anti-fH circulantes

Para la detección de inmunocomplejos fH:anti-fH, se tapizaron placas de ELISA con los anticuerpos monoclonales anti-fH OX24 (unión a SCR5) o A229 (unión al C-terminal), o con un anticuerpo policlonal anti-fH generado en conejo, todos ellos del isotipo IgG. Tras el bloqueo con PBS-BSA al 1%, se añadieron las muestras de suero de los pacientes y se incubaron durante una hora a 37 °C. La presencia de complejos fH:anti-fH se detectó con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa.

En un procedimiento alternativo, se utilizaron bolitas de Agarosa-proteína G para purificar los inmunocomplejos fH:anti-fH del suero de los pacientes. Las proteínas unidas a la proteína G se eluyeron con tampón de carga para SDS-PAGE, se separaron en geles al 10%, y a continuación se analizaron por *Western-blot* utilizando suero anti-fH humano (Merck, Budapest, Hungary).

6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y ENSAYOS DE WESTERN-BLOT

Para identificar deficiencias completas de fH o de las proteínas FHRs, y detectar bandas anómalas, se realizaron ensayos de *Western-blot* con diferentes anticuerpos policlonales frente a estas proteínas (Abarrategui-Garrido *et al*, 2009). Los geles de SDS-PAGE se realizaron según el método descrito por Laemmli (1970). Las muestras de suero o plasma se diluyeron en tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol, SDS y azul de bromofenol), en condiciones reductoras se añadió β -mercaptoetanol 430 nM. A continuación, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se separaron por duplicado en 2 en minigeles (7 x 9 x 0,1 cm) de poliacrilamida en presencia de SDS (*Stacking gel* al 5%; *Running gel* 8% o 10%). La electroforesis se realizó en una cubeta MiniProtean 3 (Bio-Rad), en las siguientes condiciones: 15 min a 50 mA, 15 min a 75 mA, 1 hora a 100 mA. Tras la electroforesis, cada gel se equilibró durante 10 minutos en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8, glicina 192 mM y metanol 20%) previamente enfriado a 4 °C. Posteriormente, las proteínas presentes en los 2 geles se transfirieron a sendas membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA) en una cubeta de transferencia "Trans-blot cell" (Bio-Rad) durante 1 hora a voltaje constante de

100V. Una vez terminada la transferencia, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con solución de bloqueo (ECL blocking agent GE Healthcare, 2% en Tris-Tween). A continuación, cada membrana, se incubó con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. Tras 6 lavados de 5 minutos con el tampón de lavado Tris-Tween (Tris-HCL 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,2%), cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 30 minutos. Tras 6 lavados de 5 minutos con Tris-Tween, las membranas se revelaron con un sustrato quimioluminiscente (kit ECL Advance, GE Healthcare) y se expusieron entre 10 segundos y 5 minutos en una película fotográfica (Kodak). Se utilizaron anticuerpos policlonales primarios fueron generados en conejo, o monoclonales generados en ratón. Los anticuerpos secundarios fueron anti-IgGs de ratón o de conejo marcados con peroxidasa de rábano (HRP, Dako). Algunos geles se tiñeron con Azul Coomassie coloidal tras la electroforesis. Cada gel se trató con una solución de etanol al 50% y ácido fosfórico al 4% durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. El gel se lavó varias veces con H₂O, y se tiñó con *Coomassie Brilliant Blue* (CBB G-250, Merck) durante toda la noche. Pasado este tiempo, se retiró el colorante y se conservó el gel en agua destilada.

7. CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA FHR ANÓMALA

7.1 Separación cromatográfica

Las muestras de plasma-EDTA de la paciente de SHUa HUS296 se sometieron a distintas cromatografías en columnas de S-Heparina, S-Proteína A y HT-Blue (GE, Healthcare Science), siguiendo los correspondientes protocolos del fabricante.

7.2 Análisis de espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la posibilidad de separar especies moleculares según su relación masa/carga. Es una herramienta que permite identificar y caracterizar péptidos y proteínas implicadas en distintos procesos celulares. La proteína se digiere con tripsina, dando lugar a péptidos entre 500 y 1800 Da (espectros de fragmentación). Estos péptidos se analizan mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (Ionización por Láser Asistida por Matriz acoplado a un analizador de tiempo de vuelo) y se obtiene un espectro de masas del conjunto de péptidos generados por la digestión trípica de la proteína, también denominado "Huella

peptídica". Las huellas peptídicas son características de cada proteína y permiten identificarlas en una base de datos como p.e. SwissProt, NCBI, con la ayuda de los programas adecuados (MASCOT, Profound). Además de este análisis se puede realizar la fragmentación de uno o varios péptidos de la huella peptídica, mediante espectrometría de masas tipo ESI-IT (Ionización por Electrospray acoplado a un analizador de trampa iónica). Este análisis consiste en la fragmentación del péptido y la generación de un espectro de masas también llamado "espectro de fragmentación" o "espectro MS/MS". De la misma forma, los espectros MS/MS son también característicos de cada uno de los péptidos y permiten su identificación "in silico" en la base de datos. Para la caracterización de la proteína anómala identificada en la paciente HUS296, una de las fracciones obtenidas tras la purificación en HT-Blue se analizó por SDS-PAGE en 3 geles en paralelo. Tras la electroforesis, un gel se tiñó con azul Coomassie Coloidal y los otros dos geles se emplearon para *Western-blot* con los anticuerpos apropiados. Se solapó la membrana de *Western-blot* y el gel teñido con Coomassie, y las bandas del gel donde ambos coincidieron se recortaron y se enviaron a la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) para su análisis por espectrometría de masas. Las bandas que se recortaron se digirieron con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (analizador proteómico 4700, PerSeptives Biosystems, Framingham, MA, USA) para obtener su huella peptídica y posteriormente identificar las proteínas correspondientes en la base de datos NCBI, con la ayuda del programa MASCOT.

8. ANÁLISIS GENÉTICOS

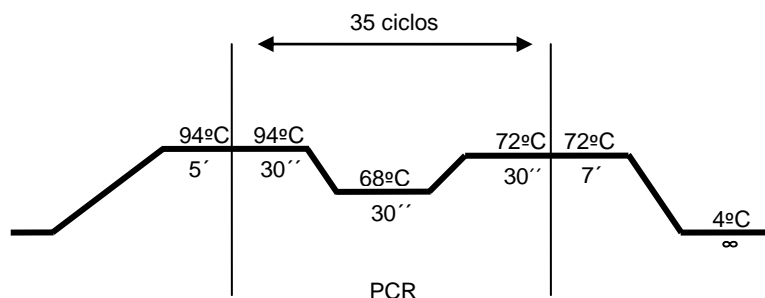
8.1 Amplificación y secuenciación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los distintos exones de los genes *CFH* y *CFHR1-5* se amplificaron a partir de DNA genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos específicos correspondientes a las secuencias intrónicas flanqueantes, y la Fidelity PCR MasterMix (Affymetrix). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20µl, con los siguientes componentes:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O estéril	5µL
MasterMix (2X)	10µL
Oligo directo (5µM)	1µL

Oligo reverso (5μM)	1μL
ADN 50ng/μl	3μL

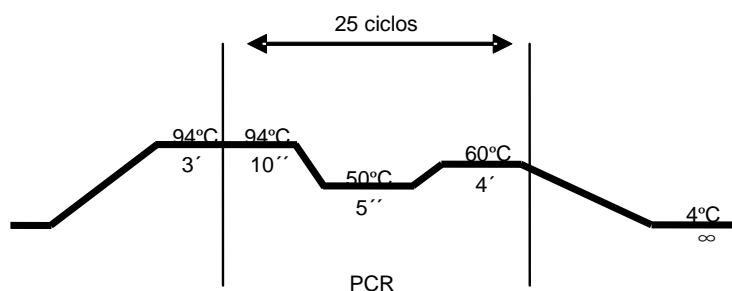
Las condiciones de la reacción fueron:



Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8) con Midori Green Advanced, según las indicaciones del fabricante (Nippon Genetics, Europe). El porcentaje de agarosa utilizado fue aproximadamente de 1,2%, en función del tamaño del fragmento de PCR generado (Sambrook *et al.*, 1989). A las muestras se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga (Ficoll 400 al 30% [p/V], azul de bromofenol 0.2%, xilencianol 0,2%, EDTA 40 mM, pH 8) antes de cargarlas en el gel, y los fragmentos amplificados se visualizaron con Midori Green. Los productos de PCR se purificaron mediante tratamiento enzimático con fosfatasa alcalina y exonucleasa I (ExoSAP-IT. USB) según las indicaciones del fabricante. Para la PCR de secuenciación de los fragmentos purificados, se utilizó BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10μL, de los cuales 2μL correspondían al fragmento purificado, y los 8 μL restantes se distribuyeron de la siguiente manera:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
H ₂ O estéril	4.6μL
Big Dye v1.1	2μL
Oligo directo ó reverso (5μM)	1μL
Sequencing buffer 5X	1μL

Las condiciones de la reacción fueron:



Cuando finalizó la reacción de secuenciación, los fragmentos generados se precipitaron con etanol para eliminar el exceso de reactivos fluorescentes que podrían dificultar la secuenciación automática. A cada muestra se le añadieron 30µL de etanol al 70%, y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos, desechando el sobrenadante. De nuevo, se añadieron 200µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, desechando el sobrenadante. El precipitado que contenía los fragmentos de la reacción se incubó a 95 °C durante 1 minuto para eliminar los restos de etanol que hubieran podido quedar en el tubo, y dejando las muestras preparadas para la secuenciación automática.

La secuenciación directa de los productos de PCR se realizó en el servicio de secuenciación del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital La Paz, mediante un secuenciador automático ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer. Los cromatogramas se analizaron con el programa BioEdit sequence Alignment Editor.

8.2. Análisis del número de copias mediante MLPA y microarray CGH

La presencia del alelo con la delección *CFHR3-CFHR1*, al igual que la variación en el número de copias en la región genómica *CFH-CFHR5* fueron analizadas por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), usando el kit P236 A1 ARMD mix 1 (MRC-Holland; Amsterdam, Netherlands). En algunos casos, la variación en el número de copias de los genes *CFH-CFHR5* se analizó utilizando un microarray CGH de esta región, desarrollado recientemente en el laboratorio del Profesor Santiago Rodríguez de Córdoba del CIB-CSIC (Tortajada *et al*, 2013).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test chi-cuadrado para comprobar el equilibrio Hardy-Weinberg (HW) en los genotipos correspondientes de los siguientes polimorfismos: *CFH* (rs3753394, rs800292, rs1061170, rs3753396, rs1410996, rs1065489), *CFHR3* (rs138675433) y *CFHR1* (rs4230, rs414628).

Las frecuencias alélicas de estos SNPs en controles y pacientes se compararon usando el test de asociación chi-cuadrado; también se calcularon el *odds ratio* (OR) y el 95% del intervalo de confianza (CI). La significación estadística se estableció en $p < 0.05$. Para evaluar el grado de ligamiento de los SNPs, se calculó la "r" de Pearson en controles y

pacientes. La frecuencia del haplotipo *CFH-CFHR3-CFHR1* en ambos grupos se estimó usando el algoritmo de máxima expectación implementado en el software R (*haplo.stats package*), y se comparó usando el test de asociación chi-cuadrado; los ORs y 95% CI correspondientes también se calcularon, y la significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

Las frecuencias del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* en función de la edad al debut, evolución de la función renal y sexo se compararon usando el test de asociación chi-cuadrado.

Los niveles de fH en los pacientes de SHUa en función del número de copias del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* (0 copias, 1 copia, 2 copias), se compararon usando el test *one-way* análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test *Tukey's post-hoc*.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA COHORTE SHUa ESPAÑOLA

1.1 Prevalencia de mutaciones, variantes de riesgo y anticuerpos anti-fH en la cohorte española de SHUa

La cohorte española de SHUa resulta de la colaboración entre la Dra. Pilar Sánchez-Corral Gómez, la Dra. Margarita López Trascasa y el Profesor Santiago Rodríguez de Córdoba, iniciada en el año 1999 para el estudio de las bases moleculares de esta enfermedad y la identificación de correlaciones genotipo-fenotipo de utilidad clínica. En Junio de 2014, esta cohorte incluye muestras de ADN, suero, plasma y datos clínicos de 367 pacientes (195 mujeres y 172 hombres) que fueron diagnosticados de SHUa de acuerdo con el criterio clínico de fallo renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. La mayoría de los pacientes son europeos (305 de España y 21 de otros países), 21 son de África del Norte (Marruecos, Túnez, Argelia, Mauritania, Libia, Nigeria y Senegal), 19 son americanos (13 de América del Sur y Central, y 6 de USA) y 1 paciente procedente de Pakistán. En función de la edad al debut de la enfermedad, nuestra cohorte incluye 124 casos pediátricos (*i.e.* edad al debut menor de 18 años) y 221 casos adultos, además de 22 pacientes adicionales de los que no se conoce este dato. Se documentó historia familiar de SHUa en 47 pacientes. Los niveles de C3, C4, fH y fI en plasma, así como la expresión de MCP en PBLs, se determinaron a partir de las muestras de sangre de cada paciente. También se analizó la presencia de autoanticuerpos anti-fH por ensayo ELISA, y se analizaron por *Western-blot* las proteínas fH y FHR en muestras de suero o plasma. Se detectaron autoanticuerpos anti-fH en 14 pacientes, entre 1 y 8 años de edad en el debut de la enfermedad (Tabla 1). Esta frecuencia representa el 11.3 % (14/124) de los casos pediátricos de la cohorte. La mayoría de los pacientes con autoanticuerpos anti-fH (12/14) presentan deficiencia completa de FHR-1, lo que confirma la fuerte asociación entre esta deficiencia y la generación de anticuerpos anti-fH descrita en otras cohortes (Zipfel *et al.*, 2007; Dragon-Durey *et al.*, 2009). Además, tres pacientes tienen también mutaciones en *CFH*, *MCP* o *THBD*, como ya se había observado en otros pacientes con anticuerpos anti-fH (Moore *et al.*, 2010).

Los análisis mediante *Western-blot* identificaron deficiencias en proteínas FHRs en 36 pacientes (9,8% del total). La situación más frecuente es la deficiencia combinada de

FHR-1 y FHR-3 (29 pacientes), seguida de la deficiencia de FHR-3 (4 pacientes), deficiencia de FHR-1 (1 paciente), deficiencia de FHR-4 (1 paciente), y deficiencia combinada de FHR-1 y FHR-4 (1 paciente). Hasta la fecha, no se han observado deficiencias aisladas de FHR-3 o FHR-4 en los individuos control analizados.

La frecuencia de mutaciones, individuales o combinadas, en los genes del complemento *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB* y *C3* es del 33,2% (13,35% *CFH*, 7,12% *MCP*, 5,34% *CFI*, 3,56% mutaciones combinadas, 2,37% *C3*, y 1,48% *CFB*). Se observaron mutaciones en *THBD* y/o *DGKE* en 12 pacientes, 4 de los cuales también tenían mutaciones en algún gen del complemento. Como cabría esperar, la proporción de pacientes con mutaciones es significativamente mayor en los casos de SHUa primarios que en los casos secundarios (37,35% versus 20,69%, $p=0.004$) (Tabla 2). En los casos de SHUa secundarios la frecuencia más alta de mutaciones corresponde al subgrupo de pacientes que tomaron anticonceptivos orales u otros fármacos previamente al debut del SHU.

Los estudios de polimorfismos muestran que el haplotipo *MCPggaac*, que confiere una mayor susceptibilidad a SHUa, está presente en el 62,4% de los pacientes (41,6% heterocigotos y 20,8% homocigotos, Tabla 1), una frecuencia muy similar al 68,3% de nuestra observación original (Esparza-Gordillo *et al.*, 2005). El haplotipo de riesgo en factor H *CFH(H3)*, definido como la combinación de los SNPs rs3753394 T, rs800292 G, rs1061170 T, rs3753396 G, rs1410996 G y rs1065489 T lo portan el 50,4% de los pacientes (38,4% heterocigotos y 12% homocigotos). Por otro lado, nuestro grupo había descrito dos alelos de *CFHRI*, y mostrado que el alelo *CFHRI*B* estaba asociado con un aumento en el riesgo de SHUa (Abarrategui-Garrido *et al.*, 2009). Sin embargo, el alelo *CFHRI*A* está asociado con un mayor riesgo de AMD (Martínez-Barricarte *et al.*, 2012). La frecuencia del alelo *CFHRI*B* en los 319 pacientes de SHUa analizados es 68,7% (43% heterocigotos y 25,7% homocigotos); esta frecuencia es casi idéntica al 69% (41% heterocigotos y 28% homocigotos) de nuestra observación original en 151 pacientes.

Tabla 1. Frecuencia de factores de susceptibilidad genética y anticuerpos anti-fH en la cohorte SHUa española. Número de pacientes con autoanticuerpos anti-fH, mutaciones y haplotipos de riesgo (*MCP*, *CFH* y *CFHR1*) en toda la cohorte. Se muestra la distribución en función del sexo (hombre/mujer), y de la edad al debut (niños, adultos ó de edad al debut desconocida).

	MUJERES (n=195)			HOMBRES (n=172)			COHORTE (n=367)	
	Niños (n=56)	Adultos (n=127)	Edad desc. (n=12)	Niños (n=68)	Adultos (n=94)	Edad desc. (n=10)	Total/Analizado	Frecuencia (%)
AutoAbs	4	1	0	9	0	0	14/367	3.81
Con deficiencia FHR-1	4	0	0	7	0	0	11	2.99
Sin deficiencia FHR-1	0	1	0	2	0	0	3	0.82
Mutaciones Genes complement	17	37	4	23	28	2	111/336	33.04
<i>CFH</i>	5	18	3	8	10	1	45	13.35
<i>MCP</i>	5	4	1	11	2	0	23	6.85
<i>CFI</i>	1	7	0	1	8	1	18	5.34
<i>CFB</i>	1	1	0	2	1	0	5	1.48
<i>C3</i>	4	3	0	0	2	0	9	2.68
Combinadas	2	4	0	1	4	0	11	3.27
Mutaciones <i>THBD</i> ^(a)	4	1	0	2	1	0	8/227	3.52
Mutaciones <i>DGKE</i> ^(b)	2	0	0	2	0	0	4/98	4.08
<i>MCPggaac</i>	25	84	7	43	54	3	216/346	62.43
HET	14	52	6	34	35	3	144	41.62
HOM	11	32	1	9	19	0	72	20.81
<i>CFH(H3)</i>	25	69	5	27	47	3	176/349	50.42
HET	17	46	4	24	40	3	134	38.4
HOM	8	23	1	3	7	0	42	12.03
<i>CFHR1*B</i>	33	78	6	41	58	3	219/319	68.66
HET	21	43	4	30	36	3	137	42.95
HOM	12	35	2	11	22	0	82	25.71

^(a) 3 de estos pacientes también tienen mutaciones en *CFH* o *CFB*.

^(b) 3 de estos pacientes también tienen mutaciones en *C3* o *THBD*.

Tabla 2. Frecuencia de mutaciones en casos de SHUa primarios y secundarios. Número de casos de SHUa primarios y secundarios en la cohorte de SHUa española. Los casos secundarios se han subdividido en función de los desencadenantes/condiciones subyacentes. Se muestra el porcentaje de pacientes mutados en cada grupo y subgrupo.

	Número de pacientes (porcentaje)	Frecuencia de mutaciones en cada grupo
COHORTE	367 (100%)	33.04%
SHUa primario	273 (74.39%)	37.35% ^(a)
SHUa secundario	94 (25.61%)	20.69% ^(a)
Post-Trasplante	47 (12.81%)	4.76% ^(b)
Fármacos	30 (8.17%)	41.38% ^(b)
Embarazo/Postparto	17 (4.63%)	25% ^(b)

^(a) Las diferencias en la frecuencia de mutaciones fue estadísticamente significativa (Fisher's exact test, p=0.005)

^(b) Las diferencias en la frecuencia de mutaciones fue estadísticamente significativa (Pearson's chi-squared test, p=0.001)

2. ASOCIACIÓN DE VARIANTES DE FACTOR H, FHR-3 y FHR-1 EN UN HAPLOTIPO EXTENDIDO QUE CONFIERE RIESGO A SHUa

2.1 Estudio de la variante c.721T en *CFHR3* y su asociación con SHUa

En nuestra cohorte de SHUa el 91% de los pacientes homocigotos para el haplotipo de *CFH(H3)* son también homocigotos para la variante *CFHR1*B*. Estos datos sugieren fuertemente la existencia de un haplotipo extendido *CFH(H3)-CFHR1*B* que confiere mayor riesgo a SHUa. Para probar esta hipótesis, seleccionamos el polimorfismo c.721C>T (rs138675433) del exón 5 en *CFHR3*, que genera un cambio de aminoácido de prolina a serina en el aminoácido 241 (dominio SCR4) de la proteína FHR-3.

El análisis del polimorfismo *CFHR3* c.721C>T se realizó en un total de 326 pacientes de SHUa y en 92 individuos control, en los cuales se había determinado la dosis génica de *CFHR3* por MLPA. También se incluyeron en el análisis 43 pacientes de SHU típico y 32 pacientes con glomerulopatía C3. Observamos que el polimorfismo c.721C>T de *CFHR3* está asociado con los polimorfismos c.614-3insT (intron 4; rs201265523), c.786A>T (exon 5; rs149352569) y c.796+22T>A (intron 5; rs200264114) (Figura 9).

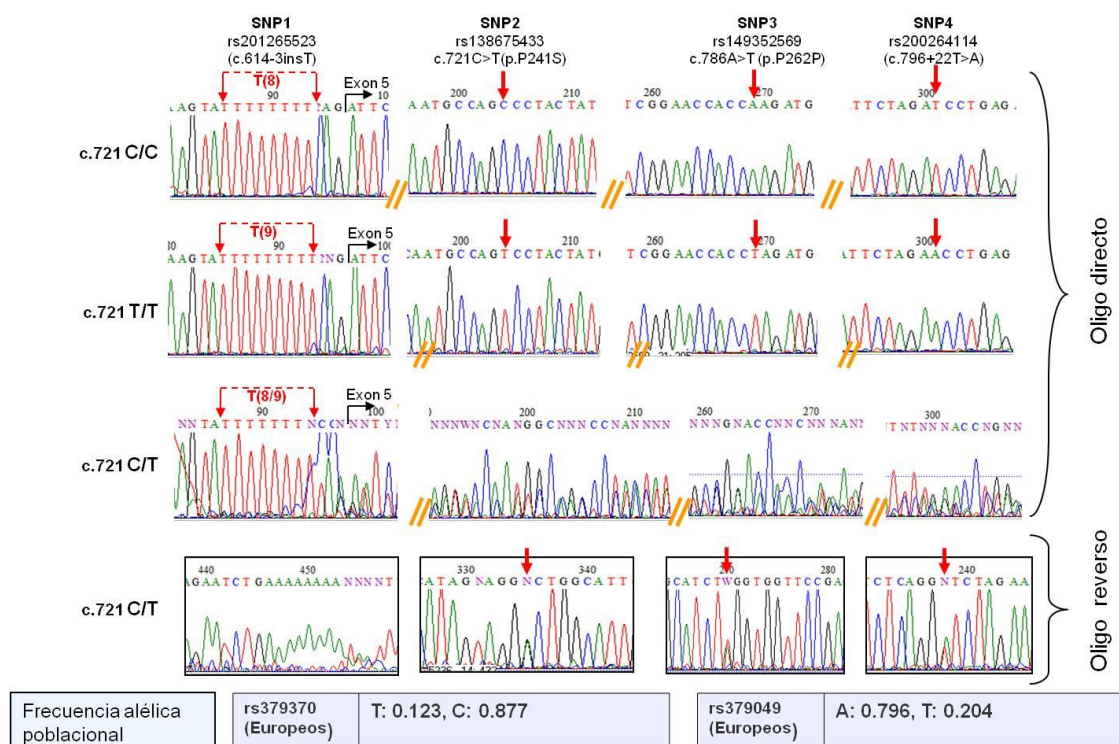


Figura 9. Análisis del polimorfismo c.721C>T en el exón 5 de *CFHR3*. Cromatogramas del exón 5 de *CFHR3* que incluyen el SNP c.721T>C (rs138675433) y 3 SNPs adyacentes que se encuentran en el mismo haplotipo. Se muestran las secuencias obtenidas en individuos homocigotos y heterocigotos que se obtuvieron con oligonucleótidos directos para la PCR. Debido a que el SNP rs201265523 introduce un nucleótido adicional que genera doble secuencia en el heterocigoto. También se muestra la secuencia obtenida con el oligonucleótido reverso.

Como se detalla en la Tabla 3, la frecuencia del alelo c.721T en individuos controles es 0,24; una frecuencia alélica similar se observó en pacientes con SHU típico (0,23), y en pacientes con glomerulopatía C3 (0,19), pero ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa. Entre los pacientes con SHUa, sin embargo, la frecuencia del alelo c.721T es significativamente mayor que en los controles (0,36 *versus* 0,24; $p=0,002$). La diferencia entre pacientes con SHUa y los controles es particularmente importante en los individuos homocigotos para la variante c.721T (0,17 en SHUa *versus* 0,01 en controles; $p<0,000$), apoyando la fuerte asociación de esta variante de *CFHR3* con el SHUa.

Tabla 3. La variante *CFHR3* c.271T confiere un mayor riesgo de SHUa. Frecuencia de las variantes c.271C y c.271T y de la delección (Del) $\Delta CFHR3-CFHR1$ en controles, pacientes SHUa, pacientes SHUt y pacientes de Glomerulopatía de C3 (C3G). Las frecuencias génicas en los cuatro grupos están también incluidas. Los análisis estadísticos se realizaron con un test de asociación *chi-squared*; los resultados de la comparación entre los controles y los pacientes con SHUa están incluidos en la tabla. Las diferencias entre los pacientes SHUt y C3G con los controles no fueron significativas.

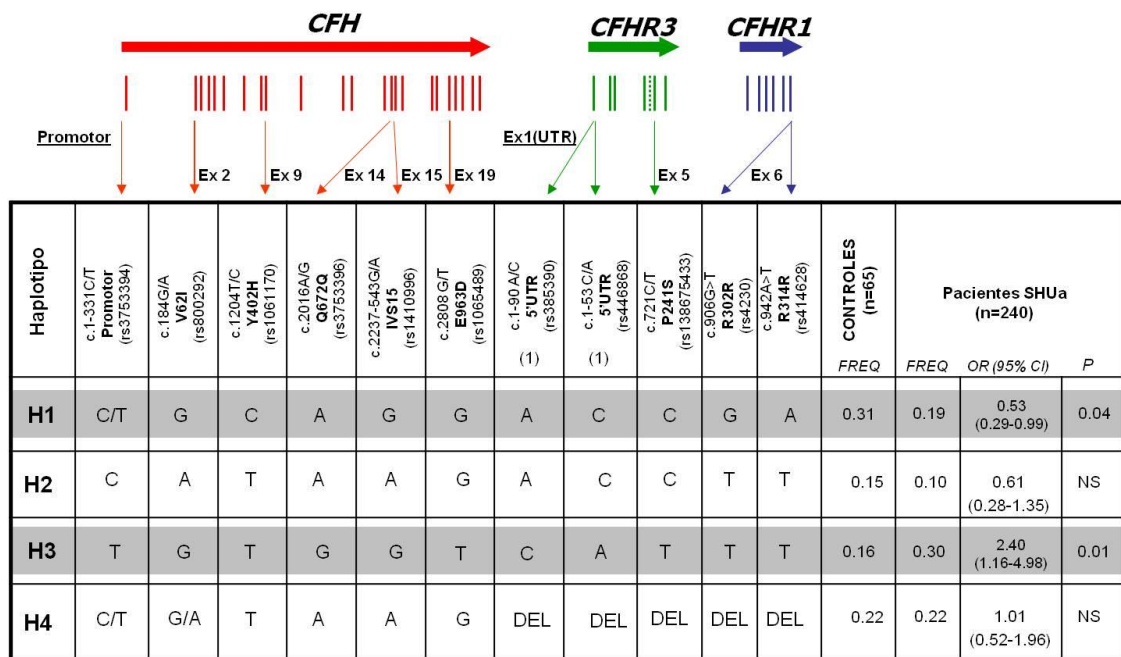
	Controles (n=92)	SHUa (n=326)	SHUt (n=43)	C3G (n=32)	<i>P</i>	OR(95%CI)
Allelos						
C	0.53	0.42	0.57	0.64	0.008	0.64 (0.46-0.89)
T	0.24	0.36	0.23	0.19	0.002	1.78 (1.22-2.59)
Del	0.23	0.22	0.20	0.17	0.762	0.94 (0.64-1.39)
Genotipo						
C/C	0.24	0.22	0.26	0.41	0.660	0.89 (0.51-1.53)
C/Del	0.26	0.14	0.33	0.25	0.001	0.48 (0.27-0.83)
C/T	0.33	0.27	0.30	0.22	0.260	0.75 (0.46-1.24)
T/Del	0.13	0.11	0.07	0.03	0.650	0.85 (0.43-1.71)
T/T	0.01	0.17	0.05	0.06	0.000	18.47 (2.52-135.37)
Del/Del	0.03	0.09	0.00	0.03	0.078	2.9 (0.86-9.73)

El análisis de otros dos polimorfismos en el exón 1 de *CFHR3* (rs385390 y rs446868) en un total de 92 pacientes con SHUa demuestra un completo desequilibrio de ligamiento entre estas variantes y el polimorfismo de *CFHR3* c.721C>T en el exón 5 (rs138675433), revelando la existencia de dos haplotipos de *CFHR3*, definidos por una combinación de SNPs del exón 1 al exón 5. Hemos nombrado estos haplotipos como *CFHR3**A (el alelo más frecuente en individuos control, etiquetado como rs385390 A, rs446868 C y rs138675433 C) y *CFHR3**B (el alelo más frecuente en pacientes de SHUa, etiquetado como rs385390 C, rs446868 A y rs138675433 T).

2.2 Análisis de las variantes *CFH*(H3), *CFHR3**B y *CFHR1**B en SHUa y caracterización de un haplotipo extendido de riesgo

Para determinar si las variantes de riesgo a SHUa de *CFH*(H3), *CFHR3**B, y *CFHR1**B representan un haplotipo único, primero se confirmó que SNPs individuales en *CFH* (rs3753394, rs800292, rs1061170, rs3753396, rs1410996, rs1065489), *CFHR3* (rs138675433), y *CFHR1* (rs4230, rs414628) estaban en equilibrio Hardy-Weinberg en nuestros controles y en la cohorte SHUa. Después se comparó la frecuencia alélica de estos SNPs en *CFH*, *CFHR3* y *CFHR1* en controles y en pacientes de SHUa, y se

observó que estaban en fuerte desequilibrio de ligamiento (datos no mostrados). Finalmente, calculamos la frecuencia de varios haplotipos *CFH-CFHR3-CFHR1* en los pacientes con SHUa (n=240) y en los individuos control (n=65). Se obtuvo un total de 14 combinaciones distintas de SNP con una frecuencia mayor del 1%, revelando diferencias significativas entre pacientes y controles para los dos haplotipos extendidos (Figura 10). La combinación más frecuente de las variantes de *CFH-CFHR3-CFHR1* en controles fue el haplotipo H1, el cual no contiene ninguna de las variantes de riesgo a SHUa. De forma inversa, en los pacientes SHUa la combinación *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* (haplotipo H3) fue la situación más frecuente (30% *versus* 16% de controles), mostrando una asociación significativa con SHUa (p=0,01; OR 2,40; 95%; CI=1,16-4,98). Por tanto, concluimos que el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* está fuertemente asociado a SHUa.

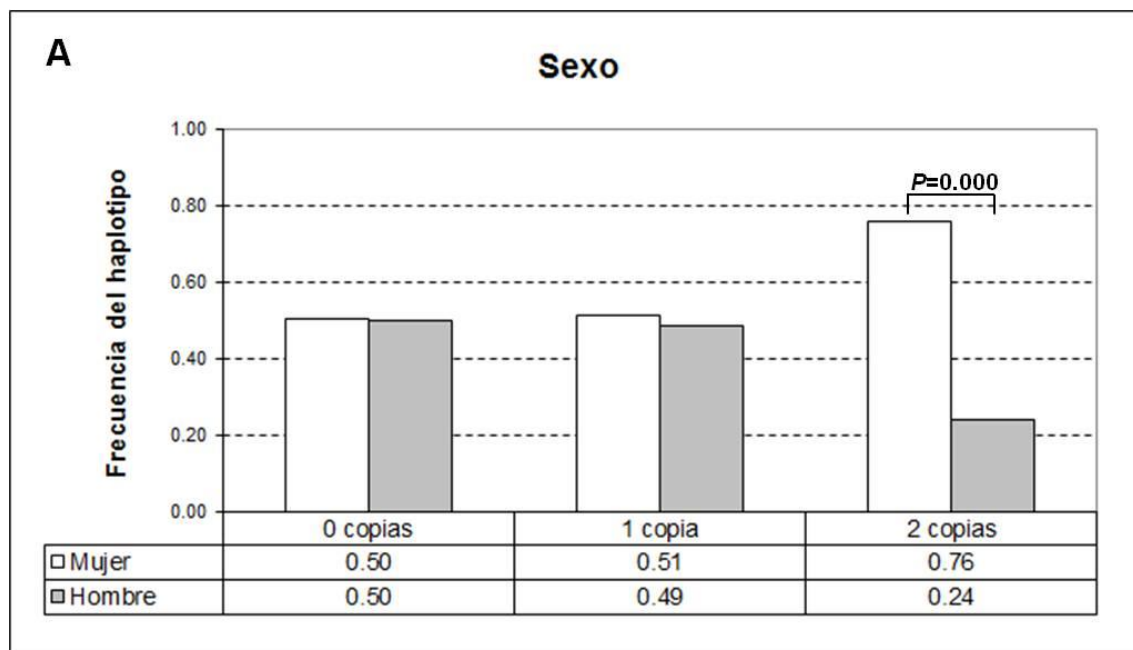


(1) Estos 2 SNPs no se incluyeron en el análisis estadístico de los haplotipos extendidos

Figura 10. Haplotipos *CFH-CFHR3-CFHR1* más frecuentes. Frecuencias de haplotipos en la región genómica *CFH-CFHR3-CFHR1* en individuos control y en pacientes de SHUa, estimadas con el software R (haplo.stats package). Cada haplotipo lleva variantes específicas de *CFH* (6 SNPs), *CFHR3* (3 SNPs) y *CFHR1* (2 SNPs). Se muestran los haplotipos con una frecuencia mayor al 3%. La frecuencia de los haplotipos en controles y en pacientes se comparó usando el test de asociación Pearson chi-squared, y las diferencias significativas están marcadas en gris.

2.3 Relevancia clínica del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*, asociación con la evolución de la función renal y penetrancia de las mutaciones

Para explorar la relevancia clínica del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*, se analizó la relación entre el número de copias del haplotipo y el género, la edad al debut y la evolución de la función renal en los pacientes de SHUa. En primer lugar, se observó una frecuencia más alta del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* en pacientes mujeres que en pacientes hombres, pero sólo en homocigosis (Figura 11 A). Al analizar la edad al debut del SHUa, se observó que la presencia del haplotipo era más frecuente en pacientes que desarrollaron la enfermedad entre 18 y 40 años que en pacientes con debut pediátrico (0-17 años) o adulto (>40 años) (Figura 11 B). Curiosamente, los pacientes con el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* presentaron una peor evolución de la función renal durante el debut de la enfermedad (Figura 11 C); así, mientras que el 36% de los pacientes sin el haplotipo de riesgo desarrollaron insuficiencia renal terminal durante el primer episodio de SHUa, esta proporción se incrementa hasta el 54% en los pacientes homocigotos para el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*.



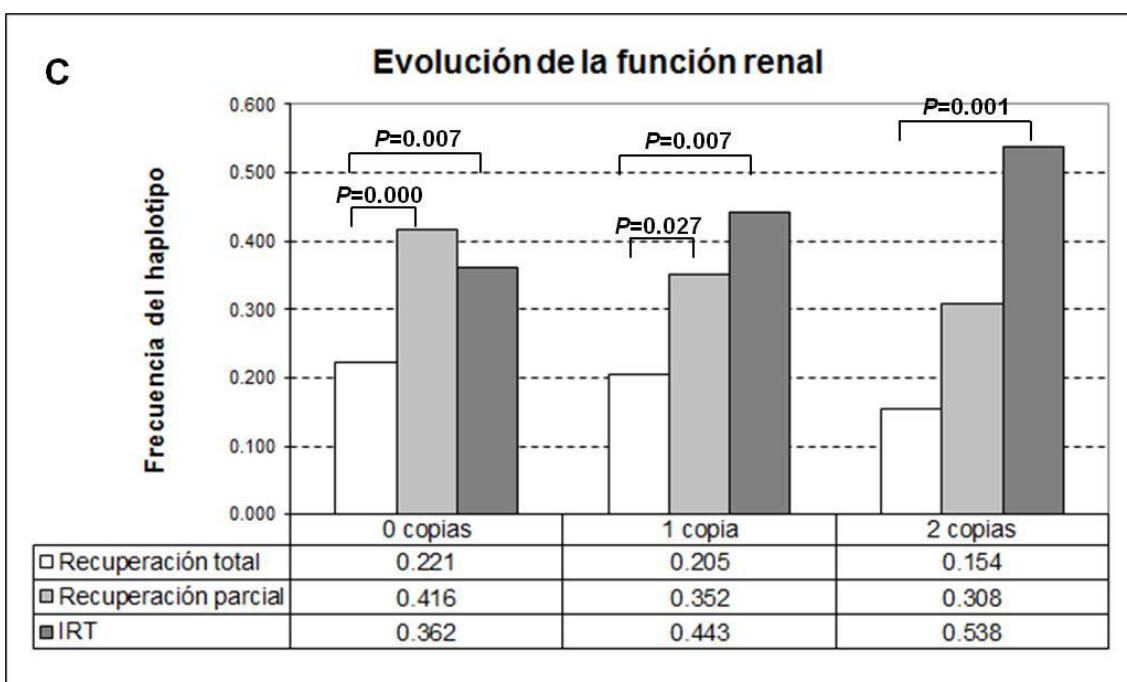
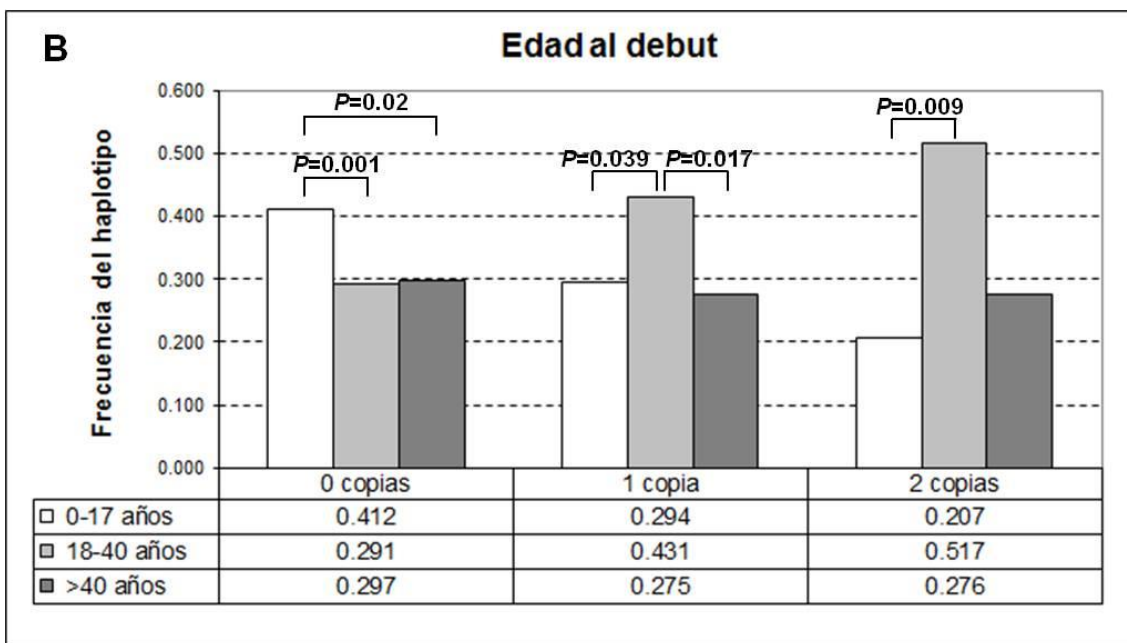
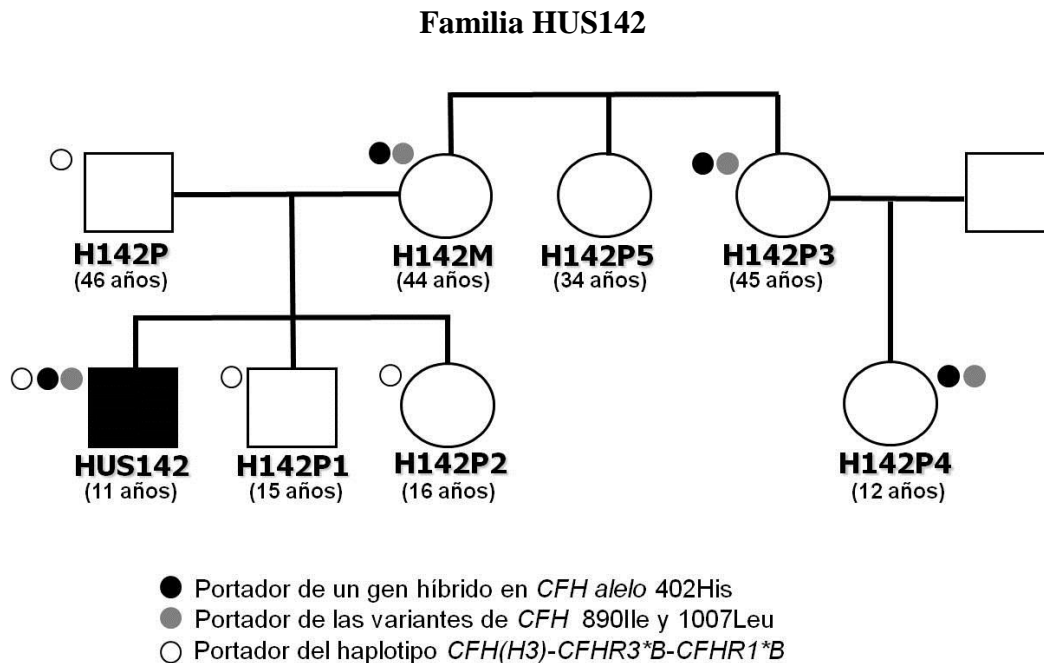


Figura 11. Relevancia clínica del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*. A) Frecuencia de pacientes de SHUa mujeres (n=174) y hombres (n=155) según el número de copias del haplotipo de riesgo. **B)** Frecuencia de pacientes de edades comprendidas entre 0-17 años (n=111), 18-40 años (n=112), o mayores de 40 años (n=90) en el primer episodio de SHUa según el número de copias del haplotipo de riesgo. **C)** Frecuencia de pacientes que presentan Recuperación renal total (n=55), Recuperación parcial (n=101) o Insuficiencia Renal Terminal (IRT; n=107) después del primer episodio de SHUa, según el número de copias del haplotipo de riesgo.

Por otro lado, observamos que el análisis de los haplotipos *CFH-CFHR3-CFHR1* en los familiares de los pacientes de SHUa puede proporcionar una información importante para explicar la penetrancia de la enfermedad en los portadores de mutaciones en genes del complemento. Dos ejemplos de nuestra cohorte se representan en la Figura 12. En la familia H142 el único miembro que ha desarrollado la enfermedad presenta un factor H mutado resultante de un gen híbrido *CFH:CFHR1* que estaba presente en distintos miembros de la línea materna (Román-Ortíz *et al.*, 2014) y un alelo que presenta el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* por línea paterna. Una situación similar es la observada en el paciente H364, quien presenta una mutación combinada de *MCP* y *CFI* heredadas de la madre y el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* de riesgo heredado del padre.



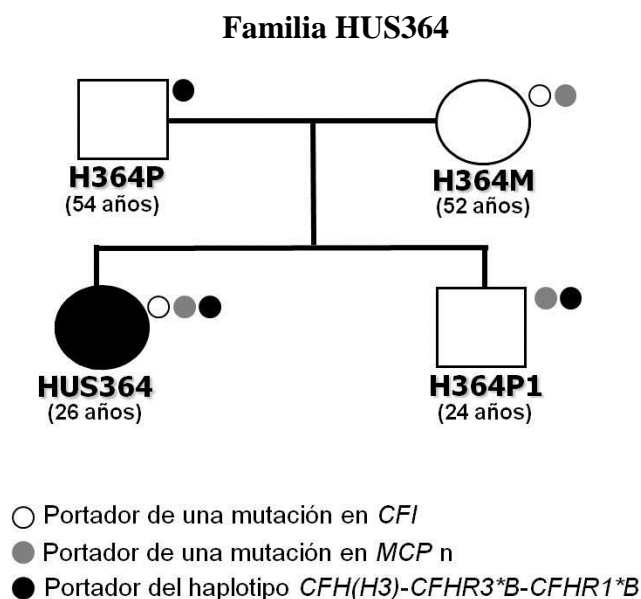


Figura 12. Influencia del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* en la penetrancia del SHUa. Segregación de mutaciones en genes del Complemento y del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* en las familias de dos pacientes españoles de SHUa. El paciente H142 tiene una copia del gen híbrido *CFH:CFHR1* (Román-Ortíz *et al.*, 2014), y el paciente H364 tiene mutaciones en *MCP* y *CFI* (datos no mostrados). Los dos pacientes también llevan una copia del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*. La edad actual de cada individuo se muestra entre paréntesis.

2.4 Estudio del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* y su asociación con los niveles de fH y la protección frente a enfermedad por meningococo

Teniendo en cuenta que el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* incluye SNPs localizados en la región promotora del gen de *CFH* (rs3753394; Caprioli *et al.*, 2003) y en el 5'UTR del exón 1 de *CFHR3* (rs385390 y rs446868), existe la posibilidad de que esos SNPs modulen la actividad transcripcional de los genes *CFH* y *CFHR3*, resultando en variaciones en los niveles de fH y FHR-3 en plasma. Con este objetivo se determinaron los niveles de fH en muestras de plasma de distintos individuos portadores de 0, 1 o 2 copias del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*. Se encontró (Figura 13) que los portadores de 2 copias del haplotipo presentan niveles significativamente más bajos de fH que los individuos con 0 copias (152 $\mu\text{g/mL}$ versus 185 $\mu\text{g/mL}$; $p=0,039$), lo cual sugiere que el riesgo que confiere el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* a tener SHUa podría estar relacionado con una actividad reguladora baja por fH en portadores de este haplotipo. Desafortunadamente, la falta de reactivos

específicos no nos ha permitido medir los niveles de FHR-3 en muestras de plasma de individuos con distintos genotipos de *CFHR3*.

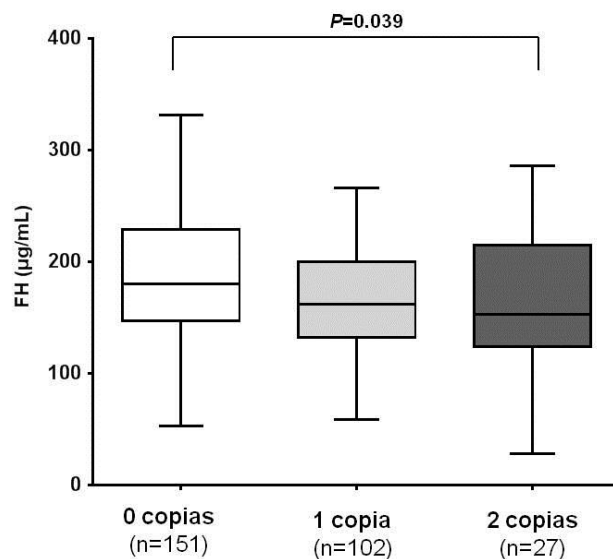


Figura 13. Relación entre el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* y los niveles de fH. Niveles de fH en muestras de plasma de individuos con 0, 1 ó 2 copias del haplotipo *CFH(H3)*. El valor medio y la desviación estándar en cada grupo están ilustrados con barras horizontales. Los niveles de fH en individuos con 2 copias de *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* fueron significativamente menores ($p=0,039$) que en individuos sin ninguna copia de este haplotipo.

Curiosamente, el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* también lleva la variante de *CFH* c.2808T (rs1065489) que está asociada con susceptibilidad reducida a enfermedad por meningococo (Dávila *et al*, 2010). Esta variante de *CFH*, que está en desequilibrio de ligamiento con tres variantes adicionales en el gen *CFHR3* (c.-90C, rs385390; c796+1060G, rs426736; c.14193C, rs371075), es característica del haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*, sugiriendo fuertemente que el mismo haplotipo está asociado a la protección frente a enfermedad por meningococo y a un aumento del riesgo de tener SHUa. Para comprobar esta posibilidad, seleccionamos 37 individuos homocigotos para el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* y 28 individuos sin él, y se genotiparon SNPs de *CFHR3* asociados a enfermedad por meningococo. Nuestros resultados demuestran claramente que las tres variantes de *CFHR3* asociadas con protección frente a enfermedad por meningococo están incluidas en el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B*, y sin embargo, este haplotipo confiere tanto un riesgo aumentado a SHUa como a protección frente a enfermedad por meningococo.

3. PROTEÍNAS FHRs (FACTOR H-RELATED PROTEINS) ANÓMALAS

Se ha descrito que en torno a un 10% de los pacientes de SHUa tienen reordenamientos génicos en la región *CFH-CFHR1-a-CFHR5* que dan lugar a mutaciones, deleciones, duplicaciones o genes híbridos. Algunos de estos reordenamientos generan proteínas anómalas con un peso molecular diferente que pueden detectarse mediante un análisis por *Western-blot*. En nuestro grupo se han identificado varias proteínas anómalas mediante esta técnica. En este apartado nos centraremos en la descripción de una proteína FHR anómala identificada en una paciente de SHUa. Los estudios iniciales fueron realizados por María Alba Domínguez, durante su estancia en el laboratorio de la Dra. Sánchez-Corral.

3.1. Caracterización del híbrido FHR-3-FHR-4 (HUS296). Caso clínico: HUS296

La paciente HUS296, es una mujer nacida en el año 1988 en Ecuador. Tuvo un hijo en octubre del 2008, y un tiempo después inició la toma de anticonceptivos orales. En febrero del 2010 fue al hospital por un dolor abdominal; los análisis revelaron que la hemoglobina y las plaquetas estaban en el rango normal, pero presentaba signos de daño renal leve (1.31 mg/dL creatinina, 500 mg/dL proteinuria y 320/ μ L microhematuria), e hipertensión (149/89 mmHg). Le recomendaron, sin éxito, que acudiera a su médico de familia para controlar la hipertensión. Lamentablemente, unos meses después fue diagnosticada de hipertensión severa e insuficiencia renal por la que requirió 5 sesiones de hemodiálisis. En julio del 2010 volvió al hospital con insuficiencia renal terminal, plaquetas bajas (140.000/ μ L) y anemia hemolítica severa (7,1 g/dL hemoglobina y hematíes fragmentados o esquistocitos). Los estudios inmunológicos fueron normales, excepto los niveles de C3 del complemento que fueron bajos (53 mg/dL; rango normal: 88-206 mg/dL). La biopsia renal mostró lesiones de microangiopatía trombótica, compatible con diagnóstico del síndrome hemolítico urémico (SHU), probablemente desencadenado por la toma de anticonceptivos orales. A la paciente se la sometió a plasmaféresis, pero tuvo que ser interrumpida tras dos sesiones debido a un hematoma post-biopsia, iniciando entonces el programa de hemodiálisis. Un año después, se consideró la posibilidad de realizar un trasplante de riñón de un donante vivo relacionado (madre), pero se descartó al no poderse excluir la existencia de factores de susceptibilidad genética al SHUa en la madre de la paciente. Actualmente, la paciente permanece estable en hemodiálisis.

3.2. Identificación de una proteína anómala por *Western-blot*

En nuestro laboratorio, se realizó un análisis de fH y las proteínas FHRs por *Western-blot* en una muestra inicial de plasma de la paciente. Este análisis mostró la presencia de una banda anómala de aproximadamente 120 kDa que fue reconocida por el anticuerpo policlonal frente a FHR-3 y FHR-4 (Figura 14). Esta banda de 120 kDa es mucho mayor que las bandas correspondientes a FHR-4 (86 kDa), FHR-3 (55 kDa) o FHR-4B (42 kDa), lo que sugiere la presencia de una proteína anómala FHR.

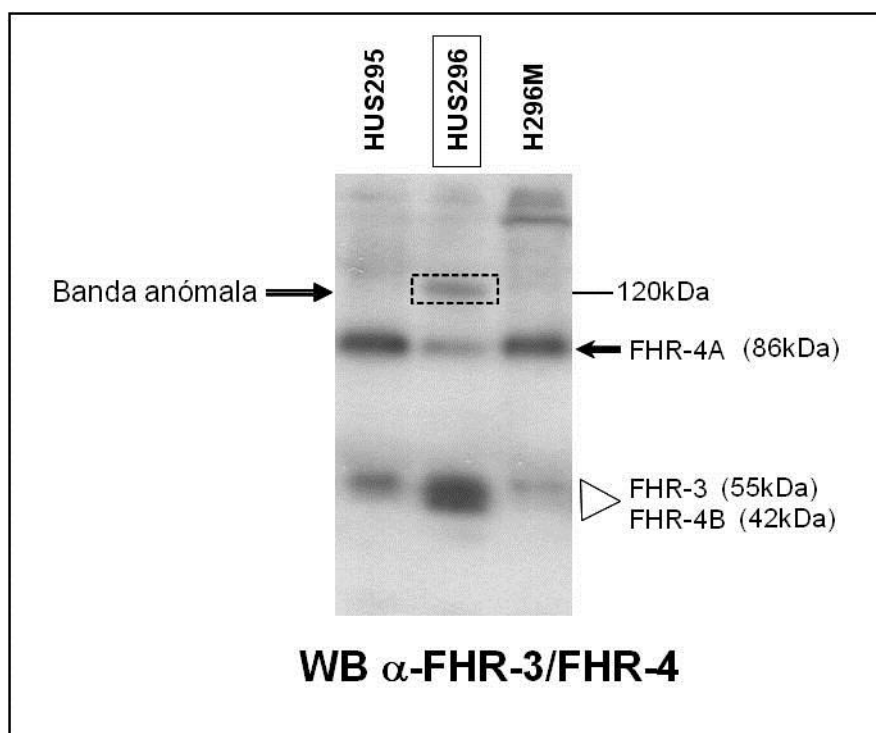


Figura 14. Análisis de FHR-3 y FHR-4A/B mediante *Western-blot* en la paciente HUS296. Una muestra de plasma de la paciente HUS296 fue separada mediante electroforesis en SDS-PAGE, e inmunodetección con anticuerpos policlonales que reconocen FHR-3 y FHR4A/B. Como controles se incluyeron muestras de plasma de la madre de la paciente (H296M) y de otro paciente de SHUa (HUS295). En el carril de la paciente HUS296 se observa una banda adicional a la altura de 120 kDa.

3.3. Análisis mutacional en genes del complemento

La presencia de una proteína de tamaño anómalo en el plasma de la paciente HUS296 sugería la existencia de alguna alteración genética. Con el objeto de identificar las posibles mutaciones o alteraciones en el genoma de HUS296, se llevaron a cabo análisis genéticos, como el análisis mutacional de *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3* y *CFB* cuyo resultado fue normal.

3.4. Análisis del número de copias

En primer lugar se realizaron análisis relacionados con la posible variación del número de copias (CNV, *Copy number variation*) en la región *CFH-CFHR5*. Primero se realizó un ensayo de MLPA, en el que se realiza un análisis de determinadas regiones del ADN mediante un conjunto de sondas que hibridarán simultáneamente en diferentes puntos de la región de interés. En nuestro caso, se realizó MLPA de la región *CFH-CFHR5* usando el kit ARMD (MRC-Holland) que contiene sondas específicas para todos los genes excepto para *CFHR4*. Como resultado, se encontró una delección en heterocigosis de la región que abarca desde el exón 6 de *CFHR3* al exón 6 de *CFHR1*. Los límites precisos de la delección no pudieron determinarse mediante esta técnica, pero se aprecia que el exón 4 de *CFHR3* y todo el gen *CFHR2* están presentes en dos copias, lo que sugiere la presencia de un gen híbrido en heterocigosis compuesto por *CFHR3:CFHR4* (Figura 15).

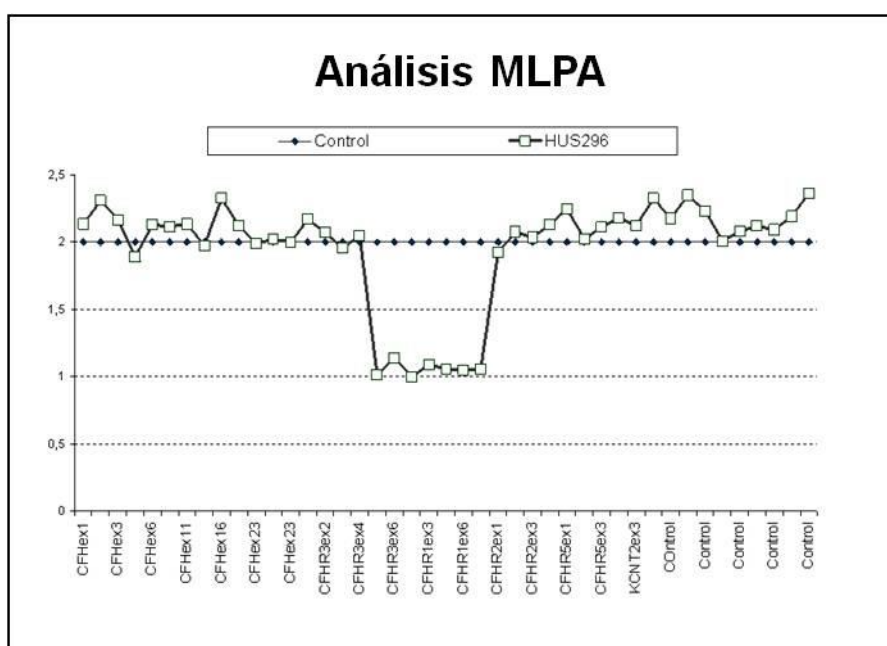


Figura 15. Análisis genético del DNA de la paciente HUS296 mediante MLPA. Representación gráfica del análisis MLPA donde se observan las alteraciones genéticas detectadas en la paciente HUS296, respecto al control. La señal de HUS296 muestra una disminución en el número de copias ($n=1$) en la región que abarca desde el exón 4 de *CFHR3* hasta el exón 6 de *CFHR1*, respecto al control que tiene las dos copias ($n=2$) esperadas en toda la región.

A continuación, para confirmar estos datos, y precisar los extremos de la delección genómica, se realizó otro análisis del número de copias, pero esta vez se llevó a cabo una hibridación genómica comparada (CGH, *Comparative Genome Hybridization*). Para ello, se utilizó un microarray de DNA diseñado en el Centro de Investigaciones Biológicas, que incorpora numerosas sondas que permiten un análisis mucho más preciso de los genes *CFH-CFHR5*. Estos análisis revelaron una delección heterocigota para la región genómica que incluía el exón 5 de *CFHR3*, el gen *CFHR1*, y los exones del 1 al 8 del *CFHR4*, sugiriendo de nuevo la existencia de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* (Figura 16).

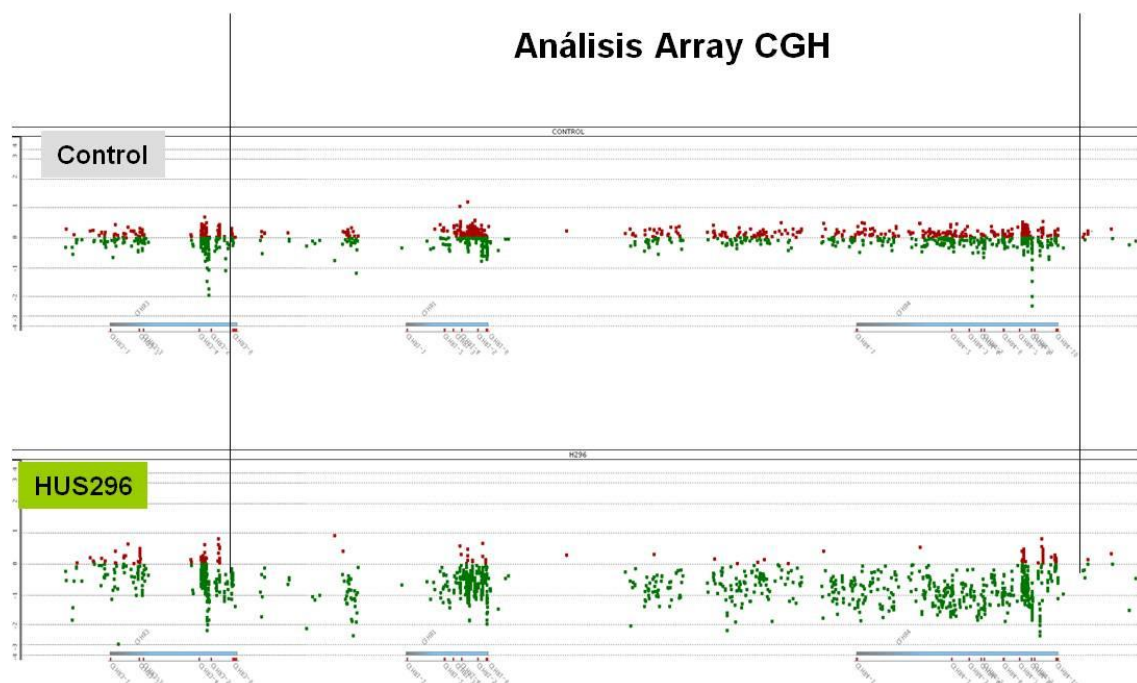


Figura 16. Análisis genético del DNA de la paciente HUS296 mediante un array CGH de alta resolución para la región CFH-CFHR5. En la parte superior se encuentra la muestra control y en la parte inferior la muestra de la paciente HUS296. El DNA de la paciente HUS296 muestra una delección en heterocigosis desde el exón 5 de *CFHR3* hasta el exón 8 de *CFHR4*.

Al comparar los resultados de las dos técnicas que analizan el número de copias, MLPA y array CGH, se ve claramente que coinciden los resultados, reforzando la hipótesis de la presencia de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* (Figura 17).

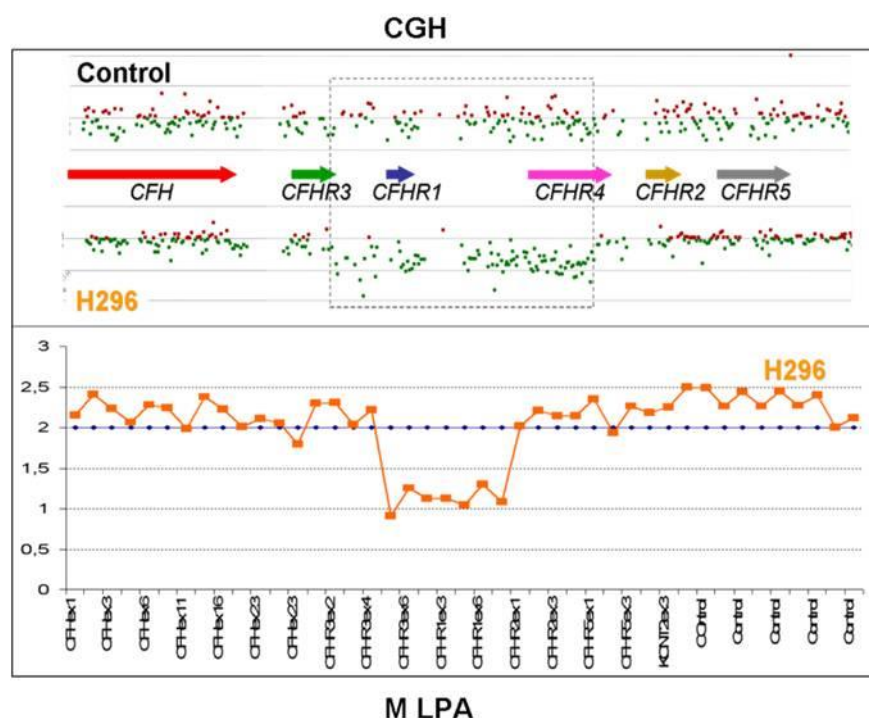


Figura 17. Comparación de los resultados de MLPA y array CGH. En la parte superior se muestran los resultados del array CGH, y en la parte inferior los resultados del MLPA. Ambos análisis revelan que el DNA de la paciente HUS296 tiene una delección en heterocigosis que abarca desde el exón 5 de *CFHR3* hasta el exón 8 de *CFHR4*. Estos análisis se realizaron en el laboratorio del profesor Santiago Rodríguez de Córdoba.

3.5. Caracterización del gen híbrido *CFHR3:CFHR4* mediante XL-PCR (EXtra Long Polymerase Chain Reaction)

Una vez conocida la presencia de una delección en heterocigosis entre *CFHR3* y *CFHR4*, quisimos saber con precisión qué secuencia contenía el gen híbrido *CFHR3:CFHR4* presente en la paciente HUS296, qué exones lo formaban y cuál era el punto de rotura (breakpoint), por el cual se unían los dos genes. Para ello se realizaron experimentos de XL-PCR con distintas combinaciones de oligonucleótidos directos de *CFHR3* y oligonucleótidos reversos de *CFHR4*. Se llevaron a cabo numerosas pruebas con varios oligonucleótidos que no generaron ningún producto hasta que finalmente la combinación del oligonucleótido directo *CFHR3*-Exón4 (5' CTTGTTCCCTCCTATAAAAGAAC 3'), y el oligonucleótido reverso *CFHR4*-Exón10 (5' GTTGTGTTTAACATATTTTGTGAGAAC 3') generó un fragmento de 6-kb. El producto de la amplificación por XL-PCR se analizó mediante electroforesis en gel de

agarosa al 1,2%. El fragmento de 6-kb se generó con el DNA de la paciente HUS296, pero no con el DNA de la madre de la paciente (Figura 18).

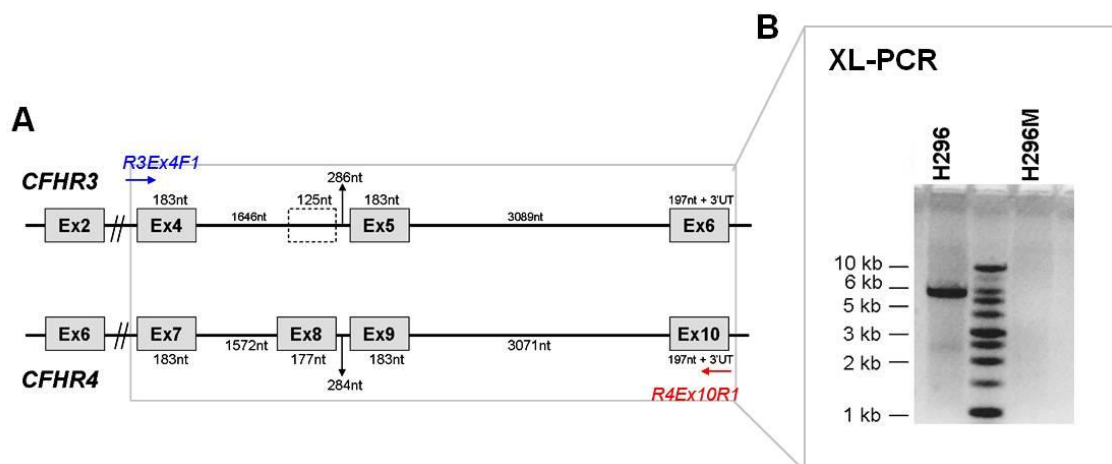
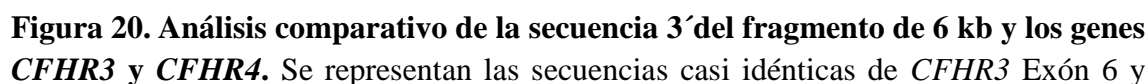
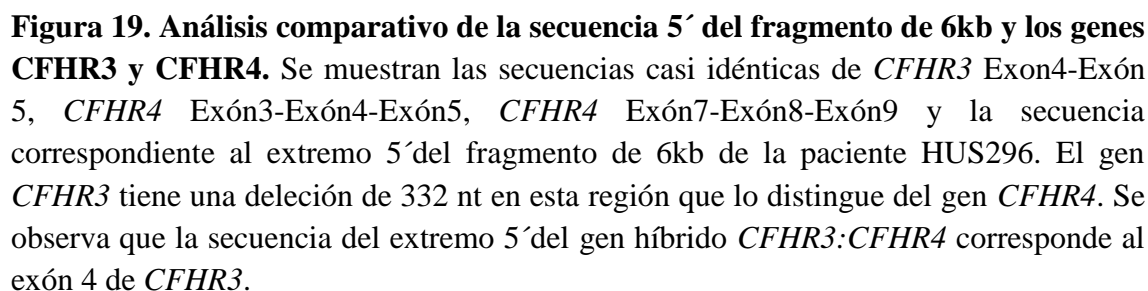


Figura 18. Generación y análisis del híbrido CFHR3-CFHR4 de la paciente HUS296 mediante XL-PCR. A. Esquema de los genes *CFHR3* y *CFHR4* con los exones homólogos alineados, donde se muestran los oligonucleótidos R3ex4F1 (azul) y R4ex10R1 (rojo) que fueron utilizados para la amplificación del gen híbrido *CFHR3:CFHR4* por XL-PCR. B. Análisis del producto de XL-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. La amplificación del DNA de la paciente (H296) dio lugar a una banda de 6-kb, mientras que el DNA de su madre (H296M) no generó ninguna banda específica.

Una vez obtenido el fragmento de 6-kb correspondiente al híbrido *CFHR3:CFHR4*, inicialmente se abordó su secuenciación directa usando múltiples oligonucleótidos específicos de ambos genes. No obstante, la alta homología existente entre *CFHR3* y *CFHR4* en algunas regiones impedía saber con certeza de cuál de los 2 genes procedían, por lo que estas regiones se clonaron en plásmidos para su secuenciación posterior, y poder tener la certeza de que se secuenciaba ese fragmento y no otra región similar. Finalmente, todas las secuencias obtenidas se alinearon con las regiones correspondientes de *CFHR3* y *CFHR4*, observándose que el extremo 5' del fragmento de 6 kb corresponde al exón 4 de *CFHR3* (Figura 19) y el extremo 3' corresponde al exón 10 de *CFHR4* (Figura 20).



CFHR4 Exón 10, comparándolas con la secuencia correspondiente al extremo 3' del fragmento de 6 kb de la paciente HUS296. Se observa que la secuencia del extremo 3' del gen híbrido *CFHR3:CFHR4* corresponde al exón 10 de *CFHR4*.

Tras la secuenciación realizada en todo el fragmento de 6kb, se confirma la existencia de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4*, compuesto por los exones 1, 2, 3, 4 y 5 de *CFHR3*, seguido del exón 10 de *CFHR4*. A continuación, tras el exhaustivo análisis genético que aportaba evidencias de que el gen híbrido estaba formado por *CFHR3* y *CFHR4*, quisimos avanzar en su caracterización a nivel de la proteína codificada por dicho gen.

3.6. El gen *CFHR3:CFHR4* y la proteína de 120kDa segregan en la familia de HUS296

Para averiguar si la formación del gen híbrido es "de novo" o es un carácter heredado de uno de los padres, se solicitaron muestras de los familiares para poder averiguar su procedencia. En paralelo a los experimentos anteriores, se obtuvieron muestras adicionales del padre, madre y hermano de la paciente. Lo primero que se analizó fue el perfil del complemento, para investigar si algún parámetro estaba alterado. Se vió que todos los valores eran normales, excepto los niveles de C3 de la paciente y su hermano que eran ligeramente bajos (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de complemento. Se muestran los niveles de componentes del complemento en los familiares y en la paciente HUS296.

Muestra	Fecha	C3	C4	fH	CFI	MCP
H296	sep-11	76,6	23,8	30,61	75	994
H296M	sep-11	124	22,7	22,87	70	112
H296P1	sep-12	74,9	23,2	12,67	70	93
H296P	dic-12	138	41,1	ND	ND	ND

A continuación, se realizaron los siguientes análisis con las muestras de los familiares: Western-blot. Se realizó un WB con el mismo anticuerpo con el que se identificó la banda anómala en la paciente (anticuerpo policlonal α -FHR-3/FHR-4). Se identificó la misma proteína de 120 kDa, producto del gen híbrido *CFHR3:CFHR4* (banda anómala), en dos muestras de la paciente, en el padre y en el hermano, pero no en la madre (Figura 21).

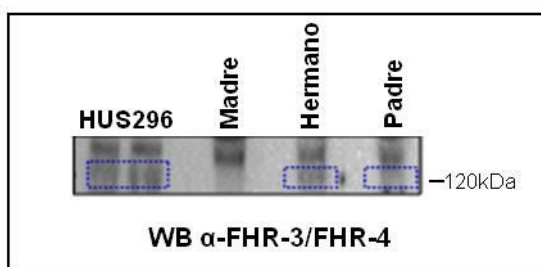


Figura 21. Identificación de la proteína anómala de 120 kDa en la familia de HUS296. *Western-blot* con anticuerpos anti-FHR-3/FHR-4 en muestras de plasma de la paciente, en su hermano y en su padre.

A continuación, se realizó una XL-PCR en las mismas condiciones en las que se generó el fragmento de 6kb correspondiente al gen híbrido *CFHR3:CFHR4* en las 2 muestras de DNA de la paciente HUS296. Este fragmento de 6 kb se generó también en el hermano y en el padre de la paciente, pero no en la madre. Esto refuerza el resultado que había salido en el WB, señalando así un origen paterno en el defecto genético (Figura 22).

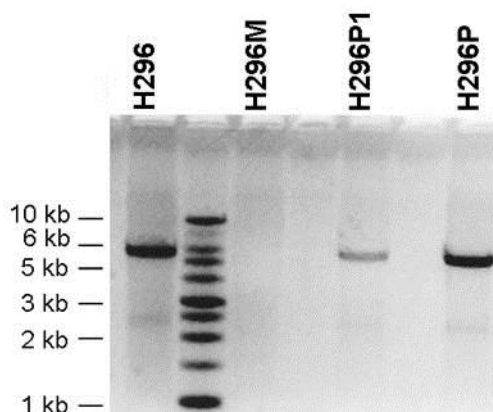


Figura 22. Análisis del DNA de los familiares de la paciente HUS296 mediante XL-PCR. Los fragmentos generados tras la XL-PCR con las muestras de la paciente (H296), madre (H296M), hermano (H296P1) y padre (H296P), se separaron en un gel de agarosa al 1,2%.

Como todo indicaba que el origen del defecto genético era paterno, se indagó en la historia familiar de este pariente para intentar averiguar algo más sobre posibles familiares afectados por esta patología. Se averiguó que una prima segunda por línea paterna tuvo una afectación renal compatible con SHUa y final fatal, sugiriendo así una asociación de la proteína anómala FHR-3-FHR-4 con la enfermedad (Figura 23).

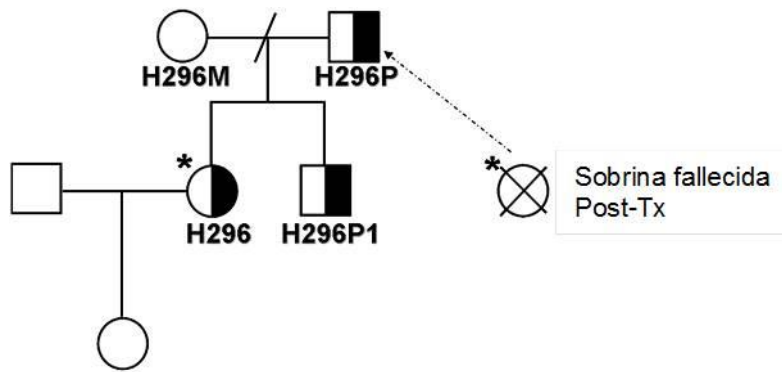
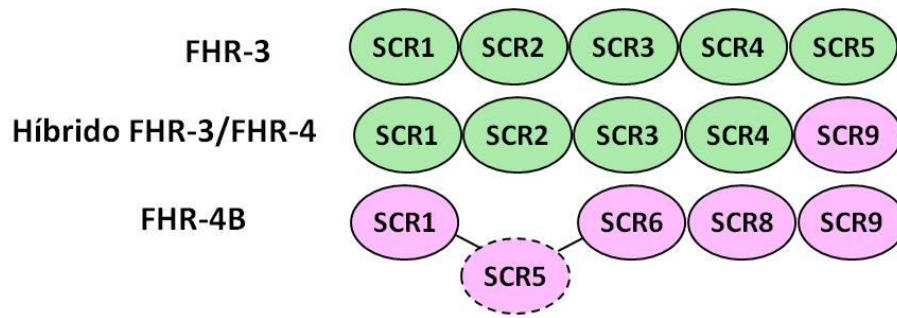


Figura 23. Árbol familiar de HUS296. Representación del árbol familiar de la paciente HUS296, donde se observa que el defecto genético es de origen paterno y que éste tuvo una sobrina con SHUa. (Los símbolos en negro marcan a los portadores del gen híbrido *CFHR3:CFHR4*).

3.7. Similitud de la proteína híbrida con otras proteínas FHRs y posible relevancia funcional

Ya se ha visto en apartados anteriores la alta similitud entre *CFHR3* y *CFHR4* a nivel de secuencia de nucleótidos. Pero a nivel de proteína, quisimos ver si la composición de la proteína híbrida difería mucho entre FHR-3 y FHR-4B (producto de *splicing* alternativo del gen *CFHR4*), debido a la alta similitud de secuencia entre ambas proteínas. Para ello, se alinearon las secuencias de aminoácidos de cada SCR de FHR-3 y FHR-4B, y se llegó a la conclusión de que la proteína híbrida FHR-3:FHR-4 sería prácticamente como FHR-3 excepto por el último exón que pertenece a *CFHR4* y no es homólogo al exón final del *CFHR3* (Figura 24).



<p>>FHR3 SCR1 (66aa)</p> <p>QVKPCDFPDIKHGGLFHENMRRPYFPVAVGKYSSYCDEHFETPSGSYWDYIHCTQNGWSPAVPCL</p>
<p>>FHR4B SCR1 (66aa)</p> <p>EVKPCDFPEIQHGGLYYKSLRRLYFPAAGQSYSYCDQNFVTPSGSYWDYIHCTQDGWSPTVPCL</p>
<p>>FHR3 SCR2 (58aa) NO TIENE DOMINIO HOMÓLOGO EN FHR4</p> <p>RKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGNSTEVACHPGYGLPKAQTTVTCTEKGWSPTPRCIR</p>
<p>>FHR4B SCR5 (62aa) NO TIENE DOMINIO HOMÓLOGO EN FHR3</p> <p>MKPCEFPEIQHGHLYENTRRPYFPVATGQSYSYCDQNFVTPSGSYWDYIHCTQDGWLPTVPCL</p>
<p>>FHR3 SCR3 (62aa)</p> <p>RTCSKSDIEIENGFISESSSIYILNKEIQYKCKPGYATADGNSSGSITCLQNGWSAQPICIN</p>
<p>>FHR4B SCR6 (62aa)</p> <p>RTCSKSDIEIENGFISESSSIYILNKEIQYKCKPGYATADGNSSGSITCLQNGWSAQPICK</p>
<p>>FHR3 SCR4 (59aa)</p> <p>EKCGPPPPISNGDTSFLLKVYVPQSRVEYQCQPYYELQGSNYVTCSNGEWSEPPRCIH</p>
<p>>FHR4B SCR8 (59aa)</p> <p>EKCGPPPPISNGDTSFLLKVYVPQSRVEYQCQSYYELQGSNYVTCSNGEWSEPPRCIH</p>
<p>>FHR3 SCR5 (64aa)</p> <p>PCIITEENMNKNNIIKLKGRSDRKYYAKTGDTIEFMCKLGYNANTSILSFQAVCREGIVEYPRCE</p>
<p>>FHR4B SCR9 (64aa)</p> <p>PCIITEENMNKNNIQLKGKSDIKYYAKTGDTIEFMCKLGYNANTSVLSFQAVCREGIVEYPRCE</p>

Figura 24. Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de FHR-3 y FHR-4B. Se muestran las secuencias de aminoácidos de FHR-3 (verde) y FHR-4 (rosa). Las diferencias entre ambas secuencias se marcan en verde o en rosa en cada caso.

Como se desconoce la función de FHR-3 y FHR-4, y por tanto la función de cada dominio de estas proteínas, no podríamos predecir con exactitud cuál es el mecanismo (ó mecanismos) por el cual se desencadena la enfermedad por un cambio en el exón

final de *CFHR3*. Por ello, una vez caracterizada la banda y viendo que existe una historia familiar previa, el siguiente paso será realizar estudios funcionales para conocer el posible mecanismo patogénico de esta proteína para que desencadene SHUa.

3.8. Purificación cromatográfica y deglicosilación de la proteína anómala de 120kDa

La diferencia de tamaño entre la proteína predicha a partir de la secuencia del híbrido *CFHR3:CFHR4* (unos 35 kDa) y la proteína de 120 kDa observada en plasma podría deberse a varios factores, como la presencia de carbohidratos, una oligomerización mediante la formación de enlaces disulfuro intercatenarios, o la formación de un complejo covalente con otras proteínas. Para tratar de resolver esta cuestión se diseñó una estrategia de purificación cromatográfica.

En nuestro laboratorio se había observado que fH y las proteínas FHRs se unen a una columna de heparina (HT-Heparin) en condiciones de baja fuerza iónica (50 mM NaCl) lo que permite separarlas de proteínas plasmáticas muy abundantes como la albúmina y las inmunoglobulinas (Abarrategui-Garrido *et al.*, 2009). Por tanto, utilizamos esta estrategia para intentar purificar la proteína híbrida FHR-3:FHR-4 presente en el plasma de la paciente HUS296. Sorprendentemente, se observó que a diferencia de fH y las proteínas FHRs, la proteína anómala de 120 kDa no se unía a heparina en condiciones de baja fuerza iónica (50mM NaCl) por lo que esta proteína se podía separar de factor H y de las proteínas FHRs nativas, pero no así de la albúmina plasmática (Figura 25).

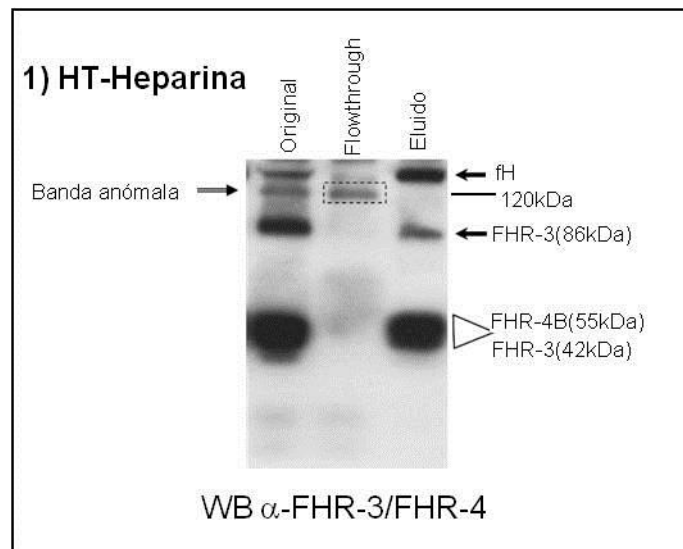


Figura 25. Análisis de la unión de la proteína anómala HUS296 a heparina. El plasma de la paciente se incubó en una columna de heparina (HT-Heparina). Se guardaron las fracciones de proteínas no retenidas (Flowthrough), y después se incubó la columna con NaCl 500mM para eluir las proteínas unidas a heparina (Eluido). La muestra original junto con las fracciones no retenidas y eluidas se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, seguido de inmunodetección con los anticuerpos policlonales α -FHR-3 y α -FHR-4. Se observa que la banda anómala de 120-kDa, no se ha unido a heparina y aparece en la fracción *Flowthrough*.

Por este motivo, la fracción *Flowthrough* de la columna de heparina se cargó posteriormente en una columna *HT-Blue*, que retiene albúmina y otras proteínas plasmáticas. La proteína anómala de 120 kDa no se retuvo en la columna *HT-Blue*, por lo que este segundo paso cromatográfico permitió eliminar también la albúmina y aumentar el grado de pureza de la muestra (Figura 26).

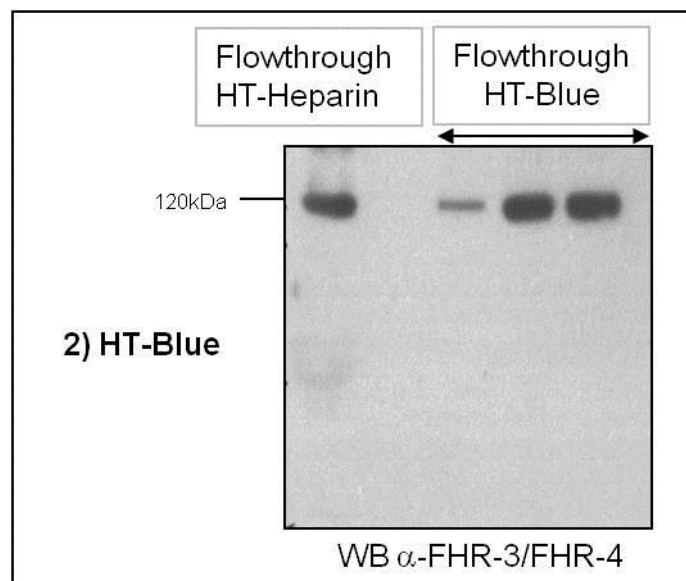


Figura 26. Purificación de la proteína anómala con una columna HT-Blue. La fracción no retenida de la columna de *HT-Heparin* (Flowthrough HT-Heparin) se pasó a través de una columna *HT-Blue*. Se recogieron fracciones de las proteínas no retenidas y se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, seguida de inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-FHR-3/FHR-4. Se observa que la banda anómala está en la fracción no retenida de la columna *HT-Blue* (Flowthrough HT-Blue). Como control se incluyó una muestra original, antes de pasar por la columna *HT-Blue* (Flowthrough HT-Heparina).

3.9. Deglicosilación

La fracción enriquecida con la proteína anómala semipurificada mediante cromatografía en *HT-Heparin* y *HT-Blue* se utilizó para posteriores estudios de caracterización bioquímica. Con objeto de analizar la posible glicosilación de la proteína, se incubó la fracción purificada que contenía la banda de 120-kDa, con la glicosidasa PNGasa-F (Peptide-N-Glycosidase F). Esta enzima es una amidasa que rompe los enlaces entre la N-Acetilglucosamina (GlcNAc o NAG) y los residuos de asparagina de N-glicoproteínas con oligosacáridos complejos (N-glicosilación). La incubación con PNGasa-F se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes para eliminar todos los posibles carbohidratos unidos a residuos asparagina de la proteína de 120 kDa. A continuación, las muestras tratadas o no con glicosidasa, fueron analizadas en dos geles idénticos mediante SDS-PAGE. Uno de los geles se tiñó con *Coomassie Coloidal Blue* (CCB) para detectar todas las bandas de proteína y el segundo gel se analizó mediante *Western-blot* con el anticuerpo policlonal α -FHR-3/FHR-4. Tras el tratamiento con

PNGasa-F, la banda de 120kDa, reconocida por el anticuerpo α -FHR-3/FHR-4, sufrió una disminución de su tamaño hasta 74 kDa y seguía siendo reconocida por estos anticuerpos. (Figura 27). Estos datos revelan que la proteína de 120 kDa contiene aproximadamente un 40% de azúcares unidos a residuos de asparagina. Aunque no podemos excluir que la proteína de 120 kDa tenga también glicosilación en residuos de Serina/Treonina (O-glicosilación), estos resultados sugieren que la diferencia de tamaño entre la proteína FHR-3:FHR-4 predicha por los estudios genéticos (unos 35 kDa) y la banda de 120 kDa observada en plasma no se debe exclusivamente a la modificación postraduccional con carbohidratos.

La coincidencia de tamaño de la banda de 120 kDa detectada por el anticuerpo anti-FHR-3/FHR-4 y la banda teñida con Coomassie, sugerían que se trataba de la misma proteína. Con objeto de analizar detalladamente su composición bioquímica, se recortaron las bandas correspondientes del gel teñido con azul de Coomassie. Dichas bandas se enviaron al Servicio de Proteómica del Parque Científico de Madrid para identificar las proteínas presentes mediante el análisis de huella peptídica (Figura 27).

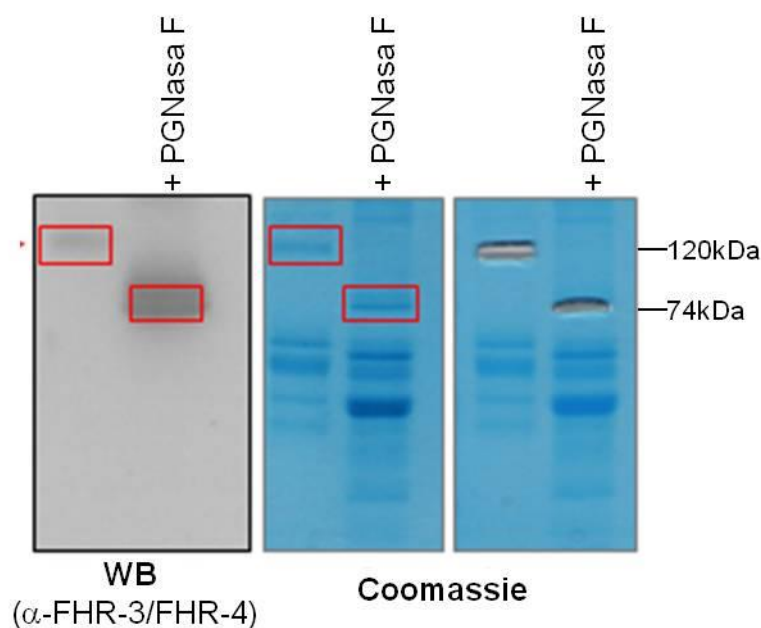


Figura 27. Deglicosilación de la proteína anómala de 120 kDa. La fracción que contenía la proteína híbrida de 120 kDa tras el paso por las columnas *HT-Heparina* y *HT-Blue*, se incubó a 37°C en presencia o ausencia de la glicosidasa PNGasa F. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en paralelo en dos geles. Las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-FHR-3/FHR-4 se recortaron del gel teñido con Coomassie para un posterior análisis mediante espectrometría de masas.

3.10. Análisis proteómico de la proteína anómala de 120 kDa

El análisis de huella peptídica en las preparaciones nativa y deglicosilada de la proteína de 120 kDa reveló la presencia de péptidos de Haptoglobina, pero no se pudieron identificar péptidos correspondientes a FHR-3 o FHR-4. Estos resultados sugerían una baja proporción de la proteína híbrida FHR-3:FHR-4 en la banda de 120 kDa aislada del gel de SDS-PAGE, lo que dificultaría la detección de péptidos específicos de la proteína híbrida con esta metodología. En este contexto, la presencia de haptoglobina en la banda de 120 kDa podría deberse, bien a una contaminación o bien a la existencia de un complejo covalente entre haptoglobina y la proteína híbrida FHR-3:FHR-4. Para realizar un análisis más exhaustivo, se diseñó un ensayo de *Selected Reaction Monitoring* (SRM). Esta técnica permite dirigir el análisis de espectrometría de masas a la identificación de unos péptidos concretos, de forma que aunque estén en baja proporción, es más probable identificarlos que con el análisis estándar (Figura 28).

Selected Reaction Monitoring

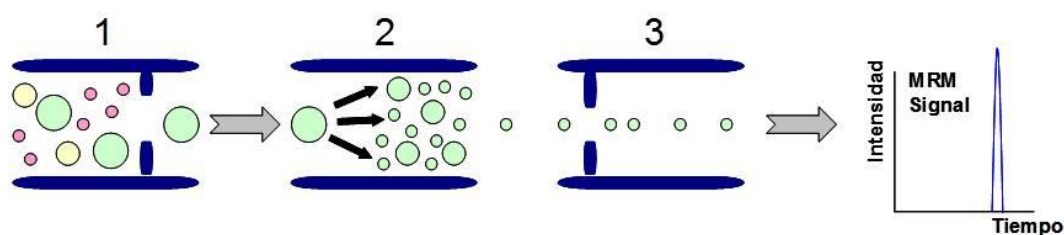


Figura 28. Esquema del análisis SRM de espectrometría de masas. Representación de la monitorización de transiciones seleccionadas.

Para llevar a cabo el análisis SRM, la fracción enriquecida con la proteína de 120 kDa obtenida tras el paso por las columnas *HT-Heparin* y *HT-Blue* se analizó mediante SDS-PAGE en tres geles en paralelo. Uno de los geles se tiñó con Coomassie y con los otros dos geles se realizaron *Western-blots* con dos anticuerpos distintos: el policlonal α -FHR-3/FHR-4 y un anticuerpo policlonal α -haptoglobina comercial. Tomando como referencia las imágenes del *Western-blot* α -FHR-3/4, se cortó la banda de 120 kDa del gel de Coomassie para su análisis SRM en el servicio de Proteómica del Parque Científico de Madrid. (Figura 29). Los resultados de este estudio demostraron la presencia de unos péptidos específicos de FHR-3 y FHR-4 en la banda de 120 kDa.

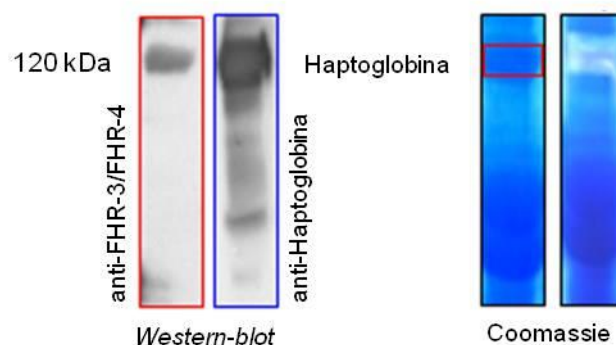


Figura 29. Análisis SRM de la proteína anómala de 120 kDa. La fracción que contenía la proteína híbrida tras el paso por las columnas HT-Blue y HT-Heparina se sometió a electroforesis en SDS-PAGE. A continuación se llevó a cabo la inmunodetección con los anticuerpos α -FHR-3/4 y α -haptoglobina. En paralelo, una réplica del mismo gel se tiñó con azul de Coomassie. El gel teñido con Coomassie se recortó y se analizó mediante SRM.

4. CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-fH EN PACIENTES SHUa ESPAÑOLES A LO LARGO DEL TIEMPO

Los autoanticuerpos anti-fH tienen un papel patogénico en SHUa ya que se unen a dominios de fH que son críticos para una regulación eficiente del complemento en superficies, por lo que provocan una deficiencia funcional de factor H. En colaboración con el Dr. Mihály Józsi, nuestro grupo caracterizó previamente los autoanticuerpos anti-fH de 4 pacientes de la cohorte española (H108, H151, H154, H177), y se observó que reconocían el dominio SCR20 (Strobel *et al.*, 2011). Quisimos averiguar si la especificidad del autoanticuerpo cambia a lo largo del tiempo, un aspecto que no se había tratado hasta ahora. Estos experimentos se realizaron durante una estancia en el laboratorio del Dr. Józsi en la Universidad Eötvös Loránd (Budapest) gracias a una beca otorgada por la EFIS (*European Federation Immunological Societies*).

4.1. Detección de autoanticuerpos anti-fH

Para poder caracterizar los autoanticuerpos, primero se identificaron los pacientes SHUa con presencia de los mismos. Para ello, se realizaron ensayos ELISA a todos los pacientes que llegan al Hospital Universitario La Paz en el servicio de Inmunología. Entre estos pacientes, se seleccionaron diferentes muestras a lo largo del tiempo de 6

pacientes distintos (19 muestras a distintos puntos temporales) de SHUa de la cohorte española, para caracterizar dichos autoanticuerpos (Tabla 5).

Tabla 5. Muestras de pacientes con autoanticuerpos. En esta tabla se representan las diferentes muestras de los pacientes SHUa de la cohorte española que se han utilizado para la caracterización de sus autoanticuerpos anti-fH.

Paciente	Fecha extracción (D/M/A)	Título anticuerpos anti fH	Comentarios
H108	07/09/2005	532	9 semanas después del 2º episodio
H108	27/20/2009	545/381	5 días después del tercer episodio
H108	10/06/2013	225	3 meses después de un trasplante renal
H108	18/11/2013	226	8 meses después de un trasplante renal
H151	19/11/2007	1700	4,5 meses después del segundo episodio
H151	17/09/2008	>2000	14 meses después del segundo episodio
H151	18/11/2008	>2000	16 meses después del segundo episodio
H154	31/07/2007	18000	1 día después del debut
H154	27/08/2007	2350	19 días después del debut, intercambio plasmático
H154	10/04/2013	405	5 años y 8 meses después del debut
H154	11/12/2013	512	6 años y 4 meses después del debut
H154	31/03/2014	525	6 años y 8 meses después del debut
H177	26/05/2008	16000/3483	9 días después del debut
H177	20/06/2008	1011	23 días después del debut, intercambio plasmático
H252	20/05/2010	884	9 días después del debut, intercambio plasmático
H252	31/07/2013	252	2,5 meses después del debut
H252	04/11/2013	258	6 meses después del debut
H271	03/01/2011	28160	1 mes después del debut
H271	20/03/2013	280	2 años y 2 meses después del debut

4.2. Identificación de la clase, subclase y cadena ligera de los autoanticuerpos

Una vez que los pacientes con autoanticuerpos anti-fH fueron seleccionados, se llevó a cabo la identificación de la subclase de IgG y el tipo de cadena ligera en todos los pacientes mediante ensayo ELISA. Se observó que todos los autoanticuerpos eran isotipo IgG3 (Tabla 6).

Tabla 6. Isotipo Ig G. Tabla con los resultados de los ensayos ELISA para detectar el isotipo Ig G y cadenas ligeras de cada muestra de los distintos pacientes.

HUS 108	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
07.09.05	NO	NO	SI	NO	SI	SI
27.02.09	NO	NO	SI	NO	SI	SI
10.06.13	NO	NO	SI	NO	SI	SI
18.11.13	NO	NO	SI	NO	SI	SI
HUS 151	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
19.11.07	NO	NO	SI	NO	NO	SI
17.09.08	NO	NO	SI	NO	NO	SI
18.11.08	NO	NO	SI	NO	NO	SI
HUS 154	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
31.07.07	NO	NO	SI	NO	SI	NO
27.08.07	NO	NO	SI	NO	SI	NO
10.04.13	NO	NO	SI	NO	SI	NO
11.12.13	NO	NO	SI	NO	SI	NO
31.03.14	NO	NO	SI	NO	SI	NO
HUS 177	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
26.05.08	NO	NO	SI	NO	NO	SI
20.06.08	NO	NO	SI	NO	NO	SI
HUS 252	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
20.05.10	NO	NO	SI	NO	NO	SI
31.07.13	NO	NO	SI	NO	NO	SI
04.11.13	NO	NO	SI	NO	NO	SI
HUS 271	anti-Ig G1	anti-Ig G2	anti-Ig G3	anti-Ig G4	Kappa cadena ligera	Lambda cadena ligera
03.01.11	NO	NO	SI	NO	SI	NO
20.03.13	NO	NO	SI	NO	SI	NO

Respecto a las cadenas ligeras, fueron únicamente kappa o lambda, excepto en uno de los pacientes (H108) que tiene de los dos tipos. En la última muestra del HUS271 la señal fue muy débil, y no se pudo identificar el isotipo IgG. (Tabla 6). También se probó la subclase IgA, pero salió negativa en todas las muestras.

4.3. Unión de los autoanticuerpos a moléculas recombinantes de fH y FHRs

Para comprobar si el dominio de reconocimiento y unión en fH y algunos FHRs cambia a lo largo del tiempo, se hicieron ensayos ELISA con las distintas muestras (obtenidas a distintos tiempos) de cada paciente. Para este propósito, se utilizaron los siguientes moléculas recombinantes y proteínas: fH (dominios 1-4), fH (dominios 8-14), fH (dominios 15-20), fH (dominios 19-20), fH, FHR-1, FHR-1 (dominios 4-5), FHR4-B, FHR5. Como se muestra en la Tabla 7, el dominio de reconocimiento parece el mismo para cada paciente a diferentes puntos temporales. Todos coinciden en tener un dominio de reconocimiento de fH en el C-terminal. No se detectó unión a FHR4-B ni FHR-5.

Tabla 7. Reconocimiento de fH y FHRs. Se muestran las representaciones gráficas de los distintos ensayos ELISA que se realizaron con las muestras de los diferentes pacientes y su unión por fH y algunos FHRs.

HUS 108	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
07.09.05	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
27.02.09	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
10.06.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
18.11.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
HUS 151	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
19.11.07	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO
17.09.08	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	NO
18.11.08	NO	NO	SI	SI	SI	NO	SI	NO	NO
HUS 154	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
31.07.07	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
27.08.07	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
10.04.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
11.12.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
31.03.14	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
HUS 177	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
26.05.08	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
20.06.08	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
HUS 252	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
20.05.10	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
31.07.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
04.11.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
HUS 271	FH[1-4]	FH [8-14]	FH [15-20]	FH[19-20]	FH	FHR1	FHR1[4-5]	FHR4B	FHR5
03.01.11	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
20.03.13	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO

4.4. Inhibición de la unión de autoanticuerpos con anticuerpos monoclonales anti-fH

Con el fin de caracterizar los epítomos de fH reconocidos por los distintos autoanticuerpos, se llevó a cabo un ensayo ELISA de competición. Los epítomos de fH se bloquearon previamente con diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos a distintos dominios de fH (mAb A254: SCR1; mAb A255: región central; mAb A229 y mAb VIG8: C-terminal; mAb C18: SCR20; y mAb IXF9: SCR18) (Figura 30) (Este experimento se repitió al menos cuatro veces).

Anticuerpos monoclonales anti-fH

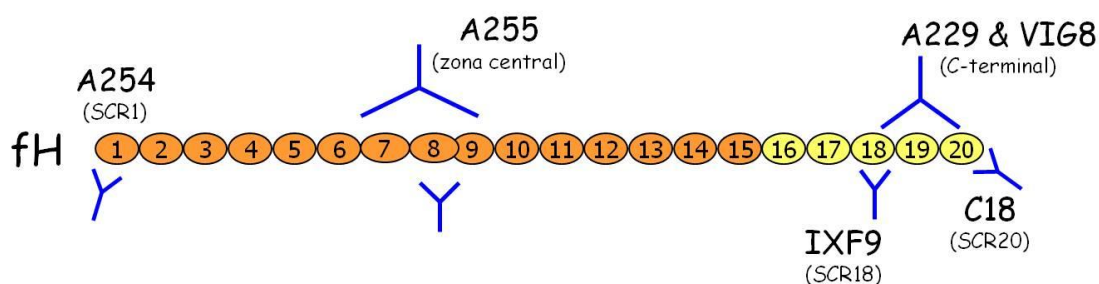
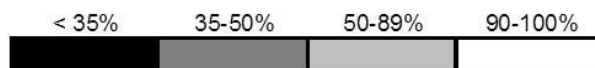


Figura 30. Anticuerpos monoclonales anti-fH. Esquema representativo de los anticuerpos monoclonales anti-fH donde se indica el dominio de reconocimiento de cada uno.

En todos los pacientes, el dominio C-terminal de fH fue el reconocido por los autoanticuerpos, y no cambió a lo largo del tiempo (Tabla 8).

Tabla 8. Ensayo de competición con anticuerpos monoclonales. Esta representación muestra el distinto grado de unión de los autoanticuerpos anti-fH de diferentes pacientes.

	A254	A255	A229	C18	IXF9	VIG8
HUS 108 (07.09.05)						
HUS 108 (18.11.13)						
HUS 151 (19.11.07)						
HUS 151 (18.11.08)						
HUS 154 (31.03.14)						
HUS 177 (20.05.08)						
HUS 177 (20.06.08)						
HUS 252 (20.05.10)						
HUS 252 (04.11.13)						
HUS 271 (03.01.11)						
HUS 271 (20.03.13)						



4.5. Determinación de la avidéz de los autoanticuerpos anti-fH

La avidéz es la fuerza de unión entre un anticuerpo multivalente y su correspondiente antígeno, es decir, la fuerza de interacción de todos los ligandos. A continuación, quisimos averiguar si la avidéz de los autoanticuerpos cambiaba a distintos puntos temporales. Para este análisis, se seleccionó la muestra más antigua y la más nueva de cada paciente (HUS108, HUS151, HUS154, HUS177, HUS252 y HUS271). Las muestras se analizaron mediante ensayos ELISA utilizando distintas concentraciones de NaSCN (0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2M). En 3 pacientes, el índice de avidéz fue parecido en la primera y la última muestra, mientras que aumentaba en la última muestra de los pacientes: HUS177, HUS252 y HUS271 (Figura 31). (Este experimento se repitió al menos tres veces).

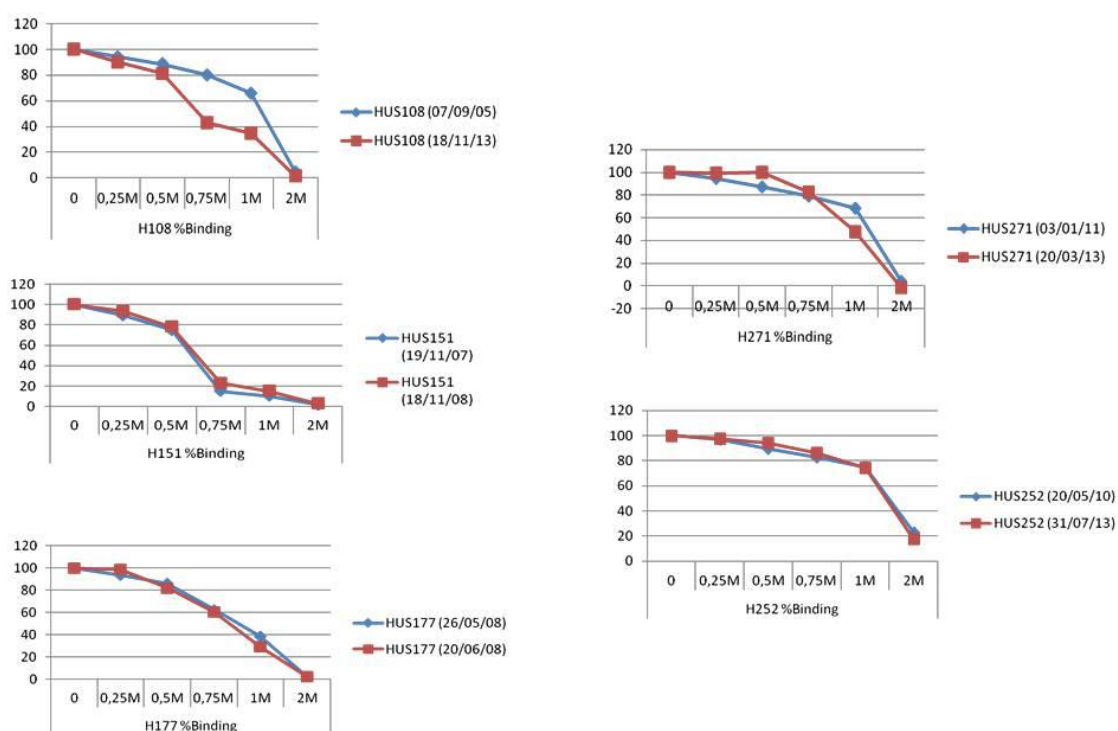


Figura 31. Índice de Avidéz. Se muestran las gráficas que representan el índice de avidéz a distintas concentraciones de NaSCN.

4.6. Identificación de complejos fH:anti-fH en plasma

Una vez analizada la presencia de autoanticuerpos anti-fH libres en los pacientes de la cohorte española de SHUa, lo siguiente que quisimos saber fue si había complejos fH:anti-fH en estos pacientes. Para este objetivo, se realizaron ensayos ELISA con el

anticuerpo monoclonal A255, que reconoce la parte central de fH, para detectar los complejos de autoanticuerpos (Figura 32).

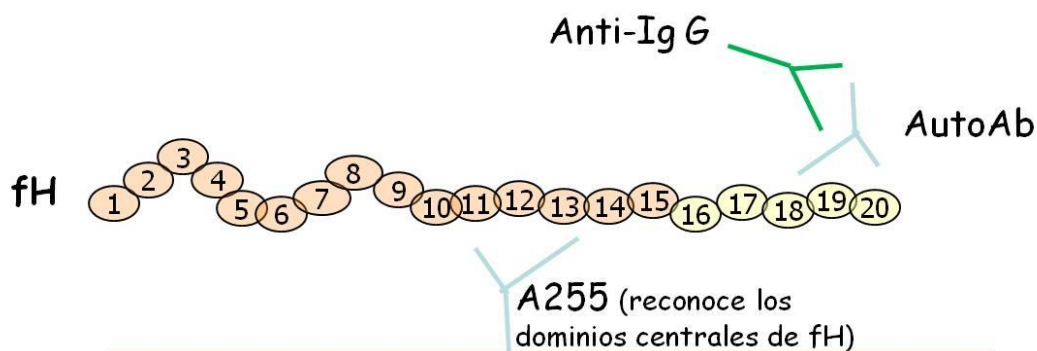


Figura 32. Esquema del ensayo ELISA para la detección de complejos fH:anti-fH. Esquema de la unión del anticuerpo A255 a fH.

Para estos experimentos, se seleccionaron la primera y la última muestra de los siguientes pacientes: HUS108, HUS151, HUS154, HUS177, HUS252 y HUS271. (Este experimento se repitió al menos dos veces) (Figura 33).

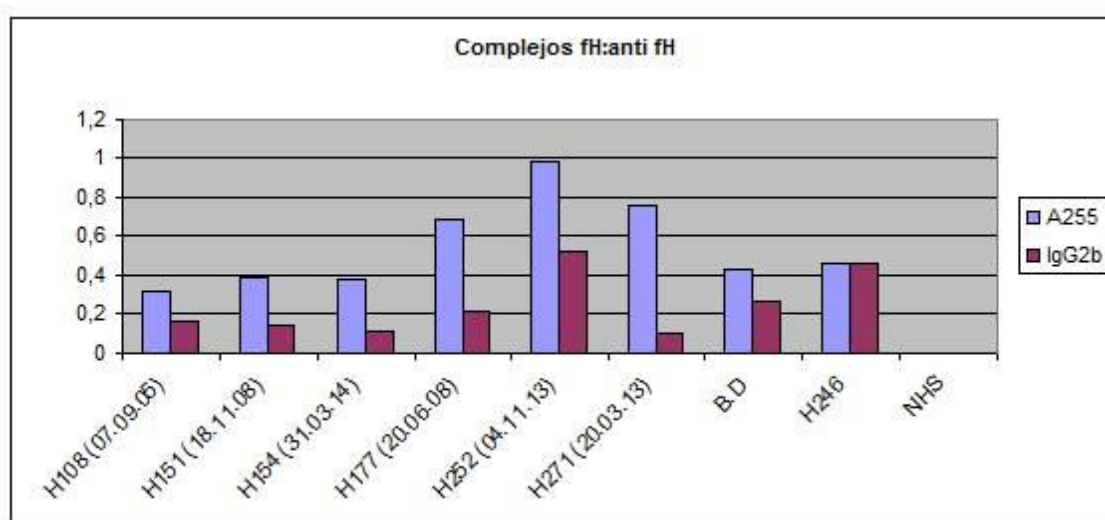


Figura 33. Presencia de complejos fH:anti-fH. Representación gráfica de los resultados de los ensayos ELISA para detectar los complejos autoanticuerpos anti-fH.

Además, el suero de los pacientes se incubó con proteína G-Agarosa, que une a moléculas de IgG. El complejo proteico resultante se eluyó y se separó mediante SDS-PAGE. Para confirmar si había complejos fH:anti-fH, se realizó un *Western-blot* en el que se utilizó para la inmunodetección un anticuerpo policlonal anti-fH (Figura 34).

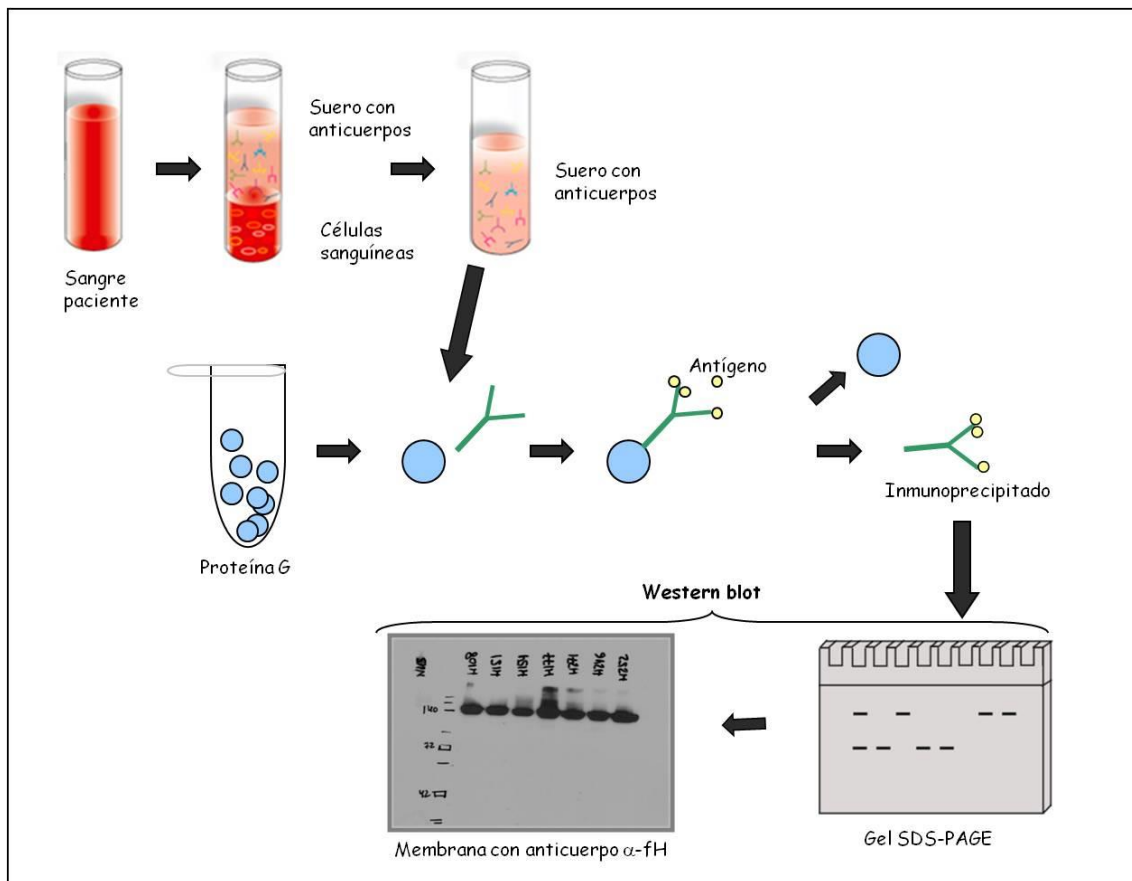


Figura 34. Detección de complejos fH:anti-fH por Western-blot. Esquema representativo de la detección de complejos fH:anti-fH por *Western-blot*.

Como se observa en la Figura 35, tanto por ensayo ELISA como por *Western-blot*, todas las muestras tienen complejos fH:anti-fH. También se realizó otro *Western-blot* con dos muestras de cada paciente y se observaron complejos en todas las muestras.

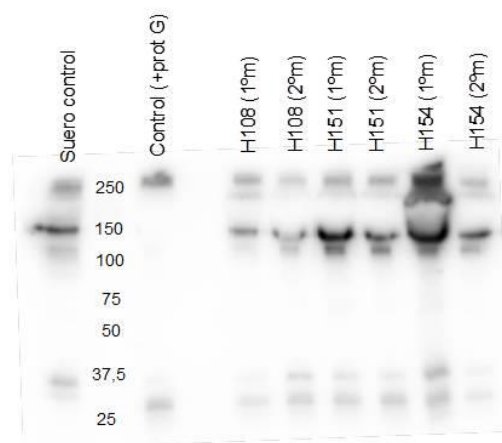
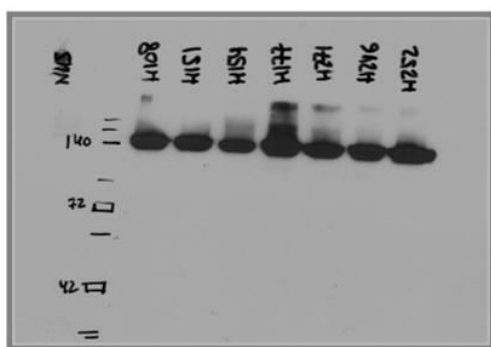


Figura 35. Complejos fH:anti-fH. *Western-blots* que muestran la presencia de autoanticuerpos anti-fH en A) muestras de los pacientes, y B) dos muestras por paciente de SHUa con autoanticuerpos.

DISCUSIÓN

La desregulación de la Vía Alternativa (VA) del complemento es el principal mecanismo patogénico en el Síndrome Hemolítico Urémico atípico (SHUa). Aproximadamente el 44% de los pacientes de SHUa tienen mutaciones simples o combinadas en los genes del complemento *CFH*, *CFI*, *MCP*, *CFB* o *C3*. Las alteraciones más frecuentes observadas en SHUa son defectos en *CFH*: mutaciones, variantes de riesgo ó autoanticuerpos, y todos ellos tienen mal pronóstico. Además, reordenamientos anómalos en la región *CFH-CFHR5* dan lugar a mutaciones, deleciones, duplicaciones o genes híbridos que se han descrito en un 10% de los pacientes de SHUa aproximadamente. Todos estos factores de susceptibilidad genética contribuyen a la manifestación del SHUa.

1. DISCUSIÓN HAPLOTIPO DE RIESGO A SHUa

En el SHUa se han descrito pacientes con mutaciones simples o combinadas en genes del complemento, o con autoanticuerpos anti-fH (Rodríguez de Córdoba *et al.*, 2014). En este estudio describimos la frecuencia genética y adquirida de los defectos en el complemento en la cohorte española de SHUa, e identificamos un factor genético nuevo de predisposición que influye en la penetrancia y evolución de la enfermedad en los portadores de mutaciones. Actualmente, la cohorte incluye 367 pacientes de SHUa seleccionados con los criterios clínicos característicos que incluyen: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo.

Se considera SHUa primario cuando la microangiopatía trombótica está asociada con desregulación del complemento, pero cuando el SHUa se produce por algún desencadenante como los inmunosupresores, anticonceptivos orales y otros fármacos se le considera secundario. En nuestra cohorte se clasificaron 273 casos primarios, y 94 casos secundarios. La frecuencia total de mutaciones en los genes del complemento en nuestra cohorte es de 33,04%. Esta frecuencia es más baja que la descrita en la cohorte francesa (50-60%) (Frémeaux-Bacchi *et al.*, 2013), aunque no es muy diferente al 40% observado en 795 pacientes de SHUa de diferentes cohortes europeas (Bresin *et al.*, 2013). Las diferencias en la frecuencia de mutaciones entre cohortes podrían explicarse parcialmente por el criterio de selección: la cohorte francesa no incluye pacientes referidos como “casos secundarios de MAT”, mientras que la cohorte española incluye todos los pacientes con un diagnóstico clínico de SHUa. Si sólo consideramos los casos

de SHUa primarios, la frecuencia de mutaciones en nuestra cohorte aumenta hasta un 37,35%, significativamente mayor que el 20,69% observado en los casos secundarios. Estos datos revelan que los estudios genéticos del complemento deberían realizarse también en casos de SHUa secundarios, particularmente en mujeres que desarrollan la enfermedad durante la toma de anticonceptivos orales, ya que son las que presentan mayor frecuencia de mutaciones (9 de 20 pacientes).

En todas las cohortes de SHUa la mayoría de las mutaciones se presentan en heterocigosis y la penetrancia del fenotipo es incompleta (en torno al ~50% en los portadores de mutaciones). Se ha descrito que las variantes de riesgo en los genes del complemento como *CFH* (Caprioli *et al.*, 2003) y *MCP* (Esparza-Gordillo *et al.*, 2005), aumentan la penetrancia de la enfermedad en los portadores de mutaciones (Bresin *et al.*, 2013). Se ha hecho cada vez más evidente que las variantes genéticas y los polimorfismos predisponen a muchas enfermedades como SHUa y DMAE. El papel de *fH* en la protección de las superficies de las células endoteliales se ha propuesto como un mecanismo fisiopatológico que podría explicar la predisposición a la enfermedad relacionándose con variaciones genéticas en las proteínas. Además variantes genéticas en otros reguladores de la activación de la vía alternativa del complemento muestran predisposición a enfermedades. Basados en el papel de la vía alternativa en muchas enfermedades, se han propuesto algunas estrategias terapéuticas que interfirieran en esta vía. En nuestra cohorte de SHUa, la frecuencia de pacientes que llevan el haplotipo de riesgo *MCPggaac* es de un 62%, mientras que el 50% lleva el haplotipo *CFH(H3)*. El alelo *CFHR1*B*, que nuestro grupo identificó como una tercera variante de riesgo de SHUa (Abarrategui-Garrido *et al.*, 2009), está presente en el 69% de los pacientes. En este trabajo, describimos por primera vez una variante de riesgo en el gen *CFHR3* (*CFHR3 c.721T*), que genera un cambio de prolina a serina en el aminoácido 241 en FHR-3, y que está asociado con un mayor riesgo a SHUa, pero no con SHUt o con glomerulopatía C3, una patología renal también asociada con la desregulación de la vía alternativa del complemento (Pickering *et al.*, 2013). Nuestro análisis revela que la variante c.721T segrega con otros SNPs de *CFHR3*, definiendo un haplotipo que se extiende al menos desde el exón 1 hasta el intrón 5 en *CFHR3*. Por tanto, hay dos alelos mayoritarios de *CFHR3* con una distribución diferente en los individuos control y en los pacientes de SHUa. El alelo *CFHR3*A* (p.241Pro) es más frecuente en los individuos control que en los pacientes con SHUa (p=0,50 *versus* p=0,42), y el alelo *CFHR3*B*

(p.241Ser) es más frecuente en pacientes con SHUa que en los controles (p=0,36 *versus* p=0,24). Análisis adicionales nos permiten confirmar que las variantes de riesgo de SHUa *CFH(H3)*, *CFHR3*B* y *CFHR1*B* segregan juntas en un haplotipo extendido que se presenta en el 30% de los pacientes con SHUa, pero sólo en el 16% de los controles, confiriendo así un aumento en la susceptibilidad a SHUa (OR=2,40; 95% CI 1,16–4,98; p=0,01). Nuestros resultados también sugieren que el haplotipo de riesgo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* se asocia con un peor pronóstico de la función renal en el debut del SHUa, y explica la penetrancia de la enfermedad en algunas familias con mutaciones. Desconocemos por qué el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* es específico de SHUa y no se asocia con otras enfermedades de desregulación del complemento, como SHUt o C3G.

El gen *CFH* codifica fH, el principal regulador de la activación del complemento en plasma, y pacientes de SHUa con mutaciones en fH tienen un pronóstico particularmente malo (Bresin *et al.*, 2013). Además, mientras que las mutaciones en factor H, MCP y factor I incapacitan a estas proteínas para realizar su función reguladora, las mutaciones en factor B o en C3 son mutaciones de “ganancia de función” que dan como resultado una C3-convertasa más activa. También es importante señalar, que factor H, factor I, factor B y C3 son proteínas plasmáticas sintetizadas fundamentalmente por el hígado, mientras que MCP se localiza en las superficies celulares. Estas características poseen importantes implicaciones en la aplicación de tratamientos con plasma y en el trasplante renal en los pacientes con SHUa.

Los genes *CFHR3* y *CFHR1* codifican FHR-3 y FHR-1, evolutiva y estructuralmente relacionados con fH, pero cuya función concreta en la activación y regulación del complemento se desconoce. Hemos observado que el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* se asocia con niveles disminuidos de fH en plasma, sugiriendo una menor regulación del complemento en los portadores de este haplotipo. Es posible que las variantes de *CFHR3*B* y/o *CFHR1*B* también influyan en la activación/regulación del complemento en la superficie endotelial, por lo que la combinación de niveles bajos de fH y una alteración en la función de FHR-3 y FHR-1 podría aumentar el riesgo de SHUa y determinar la evolución de la enfermedad.

El haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* incluye también la variante rs426736 de *CFHR3* que confiere protección frente a enfermedad por meningococo (Davila *et al.*, 2010). Una importante estrategia de *Neisseria meningitidis* para evitar el ataque del

sistema del complemento es la incorporación de fH a su superficie mediante la proteína fHbp (Schneider *et al.*, 2006; Madico *et al.*, 2006). Se trata de una interacción de alta afinidad que se verá favorecida en individuos con niveles altos de fH en plasma. Recientemente, se ha observado que FHR-3 compite con fH por la unión a fHbp en la superficie bacteriana, influyendo en su supervivencia en plasma (Caesar *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que la capacidad del meningococo para evadir el complemento del hospedador se verá afectada por los niveles relativos y la actividad funcional de fH y FHR-3, por lo que las variantes cualitativas y cuantitativas de fH y FHR-3 pueden ser cruciales para desarrollar la enfermedad por meningococo. En este contexto, la observación de que el haplotipo *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* determina niveles de fH bajos podría explicar el efecto de protección frente a la enfermedad por meningococo. Se han encontrado diferencias en los alelos *CFHR*A* y *CFHR3*B* en cuanto a la presencia de polimorfismos en la región promotora. Otra posibilidad es que los SNPs en el promotor / región 5' UTR del gen *CFHR3* resulten en un aumento de la expresión de FHR-3, mientras que los que están en la región codificante aumentan su afinidad por fHbp del meningococo, de forma que la unión de fH a la bacteria estaría disminuída.

2. DISCUSIÓN GEN HÍBRIDO EN LA PACIENTE HUS296

La evolución de la región *CFH-CFHR3-CFHR1-CFHR4-CFHR2-CFHR5* mediante sucesivos procesos de duplicación ha generado varias subregiones exón-intrón muy similares en algunos de estos genes. Esta situación favorece procesos de conversión génica y recombinación desigual que originan mutaciones, deleciones, duplicaciones y genes híbridos. Se estima que en torno a un 10% de los pacientes de SHUa presentan reordenamientos anómalos en esta región, pudiendo dar lugar a genes híbridos ó duplicados que originan proteínas con funciones alteradas. Algunas de estas proteínas tienen, además, pesos moleculares diferentes por lo que se pueden detectar mediante un análisis por *Western-blot*. Entre estas proteínas con tamaños anómalos se encuentran las resultantes de los reordenamientos *CFHR5-CFHR5* (Gale *et al.*, 2013), *CFH-CFHR3* (Francis *et al.*, 2012), *CFHR3-CFHR1* (Malik *et al.*, 2012), *CFHR1-CFHR1* (Tortajada *et al.*, 2013), *CFHR2-CFHR5* (Chen *et al.*, 2014). Mediante *Western-blot*, en nuestro grupo se han identificado varios reordenamientos distintos en la región *CFH-CFHR5*. En esta Tesis se describe por primera vez la identificación de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* en una paciente de SHUa (paciente HUS296) nacida en 1988 en

Ecuador. Poco después de dar a luz a su primer hijo, la paciente HUS296 empezó a tomar anticonceptivos orales, que probablemente fueron los desencadenantes de la enfermedad.

Con objeto de estudiar las bases moleculares de la enfermedad en la paciente HUS296, en nuestro laboratorio se realizó un análisis de fH y las proteínas FHRs por *Western-blot* en una muestra inicial de plasma de la paciente. Este análisis demostró la existencia de una banda anómala de aproximadamente 120 kDa reconocida por anticuerpos frente a FHR-3 y FHR-4. Esta proteína es mucho mayor que las proteínas FHR-4A (86 kDa), FHR-3 (55 kDa) o FHR-4B (42 kDa), lo que indicaba que la banda de 120 kDa correspondía a una proteína anómala FHR, probablemente resultante de alguna alteración genética. Con el objeto de identificar las posibles mutaciones o alteraciones en el genoma de HUS296, se llevaron a cabo análisis de posibles mutaciones en los genes *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3* y *CFB*. Sin embargo, estos análisis no mostraron ninguna mutación que pudiera explicar la presencia de la proteína anómala. Se ha descrito que la presencia de variantes en el número de copias (CNV; *Copy Number Variation*) juega un papel importante en la etiología de enfermedades complejas (Usher and McCarroll, 2015), incluyendo enfermedades que afectan a genes del sistema del complemento como *CFH* y *C4A* (Tanaka et al., 2011; Grassmann et al., 2016). Es de resaltar que CNV se define como el segmento de ADN igual o mayor de 1-kb cuyo número de copias es variable (mayor o menor) si se compara con un genoma de referencia. Por tanto, decidimos analizar la presencia de CNVs en la región *CFH-CFHR5* mediante un ensayo comercial de MLPA que contiene sondas específicas para todos estos genes excepto para *CFHR4*, y que hibridan simultáneamente en las regiones del DNA correspondientes. Como resultado, se encontró que la paciente HUS296 tiene una delección en heterocigosis de la región que abarca desde el exón 4 de *CFHR3* al exón 6 de *CFHR1*. Los límites precisos de la delección no pudieron determinarse mediante esta técnica, pero se pudo apreciar que el exón 4 de *CFHR3* y todo el gen *CFHR2* estaban presentes en dos copias, lo que sugería la presencia de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* en heterocigosis. Con el objeto de identificar mejor los extremos de la delección genómica, se realizó un nuevo análisis CNV mediante una hibridación genómica comparada (CGH, Comparative Genome Hybridization), demostrando una delección heterocigota para la región genómica que incluía el exón 5 de *CFHR3*, el gen *CFHR1*, y los exones del 1 al 8 del gen *CFHR4*. En conjunto, tanto los resultados de MLPA como

los de CGH son coincidentes y apoyan la hipótesis de un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* como consecuencia de una delección en heterocigosis que abarca desde el exón 5 de *CFHR3* hasta el exón 8 de *CFHR4*.

Una limitación de los estudios mediante MLPA y CGH era la falta de precisión en cuanto a los extremos de la delección entre *CFHR3* y *CFHR4* en la paciente HUS296. Para caracterizar con mayor precisión la secuencia de los puntos de rotura por los que se unían estos dos genes, se realizaron experimentos de XL-PCR (EXtra Long Polymerase Chain Reaction) con distintas combinaciones de oligonucleótidos directos de *CFHR3* y oligonucleótidos reversos de *CFHR4*. Después de numerosas pruebas fallidas con varias parejas de oligonucleótidos, encontramos que la combinación de un oligonucleótido directo del Exón 4 de *CFHR3* y un oligonucleótido reverso del Exón 10 de *CFHR4*, generaba un fragmento específico de 6-kb con el DNA genómico de la paciente HUS296, pero no con el DNA de su madre. La secuenciación directa de dicho fragmento y su posterior alineamiento con las regiones correspondientes de *CFHR3* y *CFHR4* permitió concluir que el extremo 5' correspondía al exón 4 de *CFHR3*, mientras que el extremo 3' correspondía al exón 10 de *CFHR4*. El fragmento de 6 kb se consiguió secuenciar casi en su totalidad mediante el empleo de oligonucleótidos internos, pero la elevada similitud secuencial entre *CFHR3* y *CFHR4* en algunas regiones del mismo impedía asignar con certeza a cuál de los dos genes correspondía. Por tanto, serán necesarios estudios futuros en los que el fragmento de 6-kb pueda ser clonado en fragmentos más pequeños para su completa caracterización y secuenciación posterior.

La existencia de diferentes de genes híbridos entre *CFH* y los genes *CFHRs* como causantes de SHUa ha sido previamente descrita (Venables et al., 2006; Eyler et al., 2013; Challis et al., 2016; Valoti et al., 2015). Sin embargo, el gen híbrido *CFHR3:CFHR4* descrito en esta tesis no se ha observado anteriormente y por tanto se trata de una aportación original en el campo. Tras el exhaustivo análisis genético que aportaba evidencias de que la paciente HUS296 tenía un gen híbrido formado por *CFHR3* y *CFHR4*, quisimos avanzar en su posible segregación familiar, tanto a nivel de genético como a nivel de proteína. En primer lugar, nos propusimos averiguar si la formación del gen híbrido *CFHR3:CFHR4* es "de novo" o es un carácter heredado de uno de los padres. Para realizar estos experimentos se obtuvieron muestras de plasma y DNA del padre, la madre y el hermano de la paciente. Mediante análisis de *Western-blot*

con anticuerpos frente a FHR-3 y FHR-4, se pudo identificar la banda anómala de 120 kDa, no sólo en la paciente HUS296, sino en también en el padre y en el hermano, pero no así en la madre. De forma similar, mediante XL-PCR se pudo amplificar el fragmento de 6-kb correspondiente al gen híbrido *CFHR3:CFHR4* en muestras de DNA de la paciente HUS296, de su hermano y de su padre, pero no en el DNA de la madre. Dado que estos datos apuntaban a que el origen del defecto genético era paterno, se investigó en la historia familiar del padre de la paciente. De esta forma se encontró que una prima segunda de la paciente por línea paterna, había tenido una afectación renal con final fatal, compatible con SHUa. En conjunto, estos datos indican un origen familiar de la enfermedad, y sugieren que la proteína anómala de 120 kDa corresponde a una proteína híbrida FHR-3/FHR-4 que segrega con el gen híbrido *CFHR3:CFHR4* en la familia de la paciente HUS296.

Con objeto de conocer el posible mecanismo patogénico por el que esta proteína FHR3/FHR4 anómala desencadena SHUa, decidimos profundizar en el estudio bioquímico de la misma. Observamos que existía una diferencia apreciable de tamaño entre la proteína anómala (120 kDa) y la predicción teórica basada en la secuencia del híbrido *CFHR3:CFHR4* (aproximadamente 35 kDa). Esta diferencia de tamaño, se debe en parte a la glicosilación de la proteína anómala, ya que tras el tratamiento con PNGasa-F (Peptide-N-Glycosidase F), la banda de 120kDa redujo su tamaño hasta 74 kDa. Por tanto, estos datos sugieren que la proteína de 120 kDa contiene aproximadamente un 40% de azúcares unidos a residuos de asparagina. Además de esta contribución, no se puede excluir que la proteína anómala tenga también glicosilación en residuos de Serina/Treonina (O-glicosilación) o que sufra una oligomerización mediante la formación de enlaces disulfuro intercatenarios con ella misma o con otras proteínas. Por ello, otro de los objetivos abordados en esta tesis ha sido la purificación de la proteína anómala a partir del plasma de la paciente HUS296, para conseguir una mejor caracterización bioquímica y funcional. Puesto que en nuestro laboratorio se había observado que fH y las proteínas FHRs se pueden purificar mediante unión a una columna de Heparina en condiciones de baja fuerza iónica (Abarrategui-Garrido et al., 2009), utilizamos esta estrategia para intentar purificar la proteína híbrida FHR-3:FHR-4 presente en el plasma de la paciente HUS296. Sin embargo, a diferencia de fH y FHRs, la proteína anómala de 120 kDa no se unió a la columna de heparina. Este

hallazgo implicaba que la proteína anómala se podía separar de factor H y las proteínas FHRs nativas, pero no así de otras proteínas plasmáticas muy abundantes, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Por tanto, las proteínas que no se unían a la columna de heparina se sometieron a un segundo paso de purificación en una columna HT-Blue, que es capaz de retener albúmina y otras proteínas plasmáticas. Así, esta segunda purificación cromatográfica permitió eliminar la albúmina y aumentar el grado de pureza de la proteína anómala, tal como se demostró mediante electroforesis en SDS-PAGE, *Western-blot* con anticuerpos anti FHR-3 y FHR-4. Un análisis proteómico inicial en las preparaciones nativa y deglicosilada de la proteína de 120 kDa reveló la presencia de péptidos de haptoglobina, pero no se pudieron identificar péptidos correspondientes a FHR-3 o FHR-4. No obstante, la fracción enriquecida tras el paso por las columnas de Heparina y HT-Blue se sometió a un análisis más exhaustivo de espectrometría de masas mediante SRM (Selected Reaction Monitoring). Los resultados de este análisis sí demostraron la presencia de péptidos específicos de FHR-3 y FHR-4 en la banda de 120 kDa. Aunque estos estudios suponen un avance en la purificación de la proteína anómala identificada en la paciente HUS296, serán necesarios más ensayos para optimizar un protocolo óptimo que pueda generar una proteína altamente purificada. En este contexto, la presencia de haptoglobina supone un reto en esta tarea. La haptoglobina es una proteína plasmática que se une a la hemoglobina libre formando complejos de hemoglobina-haptoglobina que son retirados de la circulación a través del hígado (Alayash, 2011; Schaer et al., 2014). Además, la haptoglobina es producida principalmente por hepatocitos y también por otros órganos como el riñón. Curiosamente, la microangiopatía trombótica característica de SHUa va asociada con unos niveles reducidos de haptoglobina, que constituyen un biomarcador de SHUa (Laurence, 2012) y de su remisión en el tratamiento con Eculizumab (Cugno et al., 2014). La presencia de haptoglobina en las fracciones purificadas de la proteína anómala de 120 kDa podría deberse bien a una asociación no covalente o bien a la existencia de un complejo covalente entre haptoglobina y la proteína FHR-3:FHR-4 producto del gen híbrido *CFHR3:CFHR4*. Se requerirán estudios adicionales para elucidar la posible interacción entre haptoglobina y la proteína híbrida. En cualquier caso, la optimización del protocolo de purificación de la proteína anómala de 120 kDa será un paso necesario para poder realizar estudios funcionales y elucidar así el posible mecanismo patogénico de esta proteína en el SHUa.

3. DISCUSIÓN AUTOAB

La forma autoinmune del SHUa se caracteriza por la existencia de autoanticuerpos anti-fH circulantes; también se han descrito pacientes con autoanticuerpos anti-fI, pero su relevancia en la patología no está clara.

Los autoanticuerpos anti-fH están presentes en un 6-10% de los casos pediátricos de SHUa. Estos pacientes sufren numerosas recidivas, especialmente en los dos primeros años después del debut de la enfermedad, con progresión a insuficiencia renal terminal (IRT) en un 20 al 35% de los casos y una tasa de mortalidad del 10% (Blanc *et al.*, 2012). Los anticuerpos anti-fH causan una deficiencia funcional de fH, reduciendo su capacidad para regular la vía alternativa en las células del propio organismo (Blanc *et al.*, 2015). Estos autoanticuerpos se presentan generalmente en pacientes sin mutaciones en genes como *CFH*, *CFI*, *MCP*, *CFB* o *C3*, pero están fuertemente asociados con la delección de la región *CFHR3-CFHR1* en homocigosis situación que provoca una deficiencia completa de las proteínas FHR-3 y FHR-1 en los pacientes. Puesto que otros pacientes con autoanticuerpos anti-fH también tienen deficiencia de FHR-1 como consecuencia de otras alteraciones genéticas, se considera que la falta de FHR-1 está relacionada con la generación de los autoanticuerpos anti-fH en los pacientes de SHUa (Abarrategui-Garrido *et al.*, 2009, Moore *et al.*, 2010). En este sentido, es significativo que la mayoría de estos autoanticuerpos reconozcan y bloqueen funcionalmente el extremo C-terminal de fH, así como la región homóloga en FHR-1, disminuyendo su capacidad para regular el complemento sobre superficies. Además, muchos de ellos cros-reaccionan con FHR-1, debido a su alta homología entre los SCRs 4-5 de FHR-1 y los SCRs 19-20 de fH.

Debido a que se conoce poco sobre la posible heterogeneidad y evolución de los autoanticuerpos anti-fH durante el curso de la enfermedad, hemos analizado diversas características de los autoanticuerpos anti-fH en nuestra cohorte SHUa, incluyendo el isotipo y la subclase IgG, el dominio de reconocimiento en fH y la avidéz de los pacientes. Características biológicas, como la vida media, la capacidad de activación del complemento y la unión a receptores Fc difieren entre las diferentes subclases de IgG pudiendo influir en la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, la IgG3 tiene la vida media más corta (7 días aproximadamente), entre las subclases de IgG humanas y la región bisagra más larga, permitiendo más flexibilidad de los dos brazos Fab de la molécula. Además, la IgG1 y particularmente la IgG3 están consideradas las mejores

activadoras del Complemento entre el conjunto de las IgGs. Estas características son bastante relevantes para el entendimiento de las diferencias individuales en los pacientes teniendo en cuenta el curso de la enfermedad. En nuestros resultados, se observó que al igual que en estudios previos (Blanc *et al.*, 2012; Dragon-Durey *et al.*, 2005; Jozsi *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2011) IgG3 es la subclase más prevalente en nuestro estudio (17/19 pacientes). Uno de los pacientes presentaba también autoanticuerpos anti-fH de la subclase IgG1, y otro paciente únicamente tenía autoanticuerpos IgG1. Algunos pacientes presentan autoanticuerpos con cadena ligera kappa (más frecuente) y otros con cadena ligera lambda. Sólo en un paciente con autoanticuerpos IgG3 se encontró la presencia simultánea de ambas cadenas ligeras, sugiriendo una respuesta oligoclonal de los autoanticuerpos.

Debido a que no hay datos sobre la avidez de los autoanticuerpos anti-fH en pacientes de SHUa, decidimos analizar esta característica y también si cambiaba a lo largo del tiempo. Mientras que los niveles de autoanticuerpos anti-fH y la cantidad de complejos fH:anti-fH generalmente disminuían después de la fase aguda de la enfermedad, no observamos cambios significativos en la avidez de los autoanticuerpos a lo largo del tiempo. La mayoría de nuestros pacientes con autoanticuerpos anti-fH presentan deficiencia completa de FHR-1, pero algunos contienen 1 o 2 copias de esta proteína. En los pacientes que no tienen FHR-1, la mayoría de los autoanticuerpos reconocen principalmente el dominio C-terminal de fH y FHR-1, además del fH completo. Los autoanticuerpos de pacientes con FHR-1, en cambio, son heterogéneos, ya que reconocen los dominios N- y C-terminal de fH, y en algunos casos, todos los fragmentos de fH y FHR-1 probados con intensidades similares. En resumen, en los pacientes con deficiencia completa de FHR-1 el dominio de reconocimiento de los autoanticuerpos anti-fH siempre es el C-terminal, mientras que en los que tienen FHR-1, el dominio de reconocimiento en fH es más variable. Estas características son muy diferentes de las que presentan los autoanticuerpos anti-fH identificados en pacientes con glomerulopatía C3, donde los sitios de unión de los autoanticuerpos muestran una preferencia hacia el N-terminal donde están los dominios de regulación de fH y estos no se asocian con la deficiencia de FHR-1 (Blanc *et al.*, 2015). Es interesante resaltar que aún no se ha encontrado una explicación para los autoanticuerpos anti-fH en pacientes con FHR-1 circulante.

En resumen, los datos en nuestros pacientes de SHUa confirman resultados recientes respecto a los epítomos de fH de los autoanticuerpos en SHUa en otra cohorte (Bhattacharjee *et al.*, 2015) y describen características individuales de los anticuerpos, incluyendo por primera vez su avidez a lo largo del tiempo.

Aunque el papel patogénico de los autoanticuerpos anti-fH está bien establecido en SHUa, nuestros estudios muestran por primera vez que existe una heterogeneidad de autoanticuerpos entre pacientes, pero no una variación en sus características biológicas a lo largo del tiempo en cada paciente. Estos autoanticuerpos parecen reflejar una respuesta clonal restringida, como se sugiere por la presencia de un solo tipo de cadena ligera y la limitación de los epítomos que reconocen en la mayoría de los pacientes.

En conclusión, en esta Tesis se analiza la prevalencia de mutaciones, variantes de riesgo y anticuerpos anti-fH en la cohorte española de pacientes SHUa (n=367), y se describe un nuevo reordenamiento anómalo en la región *CFH-CFHR3-CFHR1-CFHR4-CFHR2-CFHR5*. Hemos identificado 2 alelos del gen *CFHR3*, uno de los cuales (alelo *CFHR3*B*) es otro factor de susceptibilidad genética al SHUa. También se muestra la existencia de un haplotipo extendido *CFH(H3)-CFHR3*B-CFHR1*B* que está específicamente asociado con SHUa, y da lugar a niveles reducidos de fH, pero si este haplotipo produce defectos funcionales o cuantitativos de FHR-3 y FHR-1 está por determinar. Estos nuevos datos constituyen un avance significativo en la comprensión de los factores de predisposición genética al SHUa, así como en su posible repercusión clínica y funcional, y contribuirán a mejorar el diagnóstico genético en los pacientes y a la implementación de una medicina personalizada, particularmente mediante tratamientos inhibidores del complemento como el Eculizumab.

CONCLUSIONES

1. Se han analizado 367 pacientes de SHUa para mutaciones y polimorfismos en los genes del complemento *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB* y *C3*. La frecuencia de mutaciones combinadas o individuales en estos 5 genes es de 33,2% (13,35% *CFH*, 7,12% *MCP*, 5,34% *CFI*, 3,56% mutaciones combinadas, 2,37% *C3*, y 1,48% *CFB*). También se identificaron mutaciones en los genes *THBD* y/o *DGKE* de 12 pacientes, 4 de ellos con mutaciones en genes del complemento.
2. La proporción de pacientes con mutaciones en genes del complemento fue significativamente mayor en los casos primarios que en los casos secundarios de SHUa (37,35% versus 20,69%, $p=0.004$). En los casos secundarios de SHUa, la frecuencia más alta de mutaciones corresponde al subgrupo de pacientes que tomaron anticonceptivos orales u otros fármacos en el debut del SHU.
3. Se ha analizado el polimorfismo *CFHR3* c.721C>T en 326 pacientes de SHUa, 43 pacientes de SHU típico, 32 pacientes con glomerulopatía C3 y 92 individuos control. Este polimorfismo está asociado con los polimorfismos c.614-3insT (intron 4; rs201265523), c.786A>T (exon 5; rs149352569) y c.796+22T>A (intron 5; rs200264114), definiendo 2 alelos que hemos denominado *CFHR3**A y *CFHR3**B.
4. El alelo *CFHR3**B es una nueva variante de susceptibilidad genética a SHUa. Los pacientes de SHUa con la combinación de variantes *CFH*(H3)-*CFHR3**B-*CFHR1**B (haplotipo H3) muestran una asociación significativa con SHUa, lo que sugiere que el haplotipo *CFH*(H3)-*CFHR3**B-*CFHR1**B está fuertemente asociado a SHUa.
5. Se ha identificado en una paciente de SHUa una proteína anómala que segrega con un gen híbrido *CFHR3:CFHR4* de origen paterno. Se trata de un reordenamiento previamente desconocido que probablemente se asocia con la historia familiar de SHUa.
6. Se han estudiado 6 pacientes de SHUa con autoanticuerpos anti-fH, caracterizando la subclase de IgG y el tipo de cadena ligera de sus autoanticuerpos anti-fH, y siendo todos los autoanticuerpos del isotipo IgG3.

7. El dominio de reconocimiento de los autoanticuerpos anti-fH en su región C-terminal es el mismo para todos los pacientes y dentro de cada paciente a diferentes puntos temporales.
8. El índice de avidez en las muestras de pacientes SHUa con autoanticuerpos anti-fH fue distinto para cada paciente, pero dentro de cada paciente no varió en las muestras a distintos puntos temporales.
9. Se detectaron complejos fH:anti-fH circulantes en todas las muestras de los pacientes con autoanticuerpos anti-fH.

CONCLUSIONS

1. We analyzed 367 patients with aHUS for mutations and polymorphisms in the complement genes *CFH*, *MCP*, *CFI*, *CFB* and *C3*. The frequency of combined or individual mutations in these 5 genes is 33.2% (13.35% *CFH*, 7.12% *MCP*, 5.34% *CFI*, 3.56% combined mutations, 2.37% *C3* and 1.48% *CFB*). Mutations in *THBD* and / or *DGKE* genes of 12 patients, including 4 with mutations in complement genes were also identified.
2. The proportion of patients with mutations in complement genes was significantly higher in primary than in secondary aHUS cases (37.35% versus 20.69%, $p = 0.004$). In secondary aHUS cases, the highest frequency of mutations corresponds to the subgroup of patients taking oral contraceptives or other drugs in the debut of HUS.
3. The analysis of polymorphism *CFHR3* c.721C> T was performed in 326 aHUS patients, 43 tHUS patients, 32 patients with C3 glomerulopathy, and 92 control individuals. This polymorphism is associated with polymorphisms c.614-3insT (intron 4; rs201265523) c.786A> T (exon 5; rs149352569) and c.796 + 22T> A (intron 5; rs200264114), and defines two alleles named as *CFHR3**A and *CFHR3**B.
4. The *CFHR3**B allele is a risk variant to aHUS. aHUS patients with the combination *CFH*(H3)-*CFHR3**B-*CFHR1**B (haplotype H3) show a significant association with aHUS, suggesting that *CFH*(H3)-*CFHR3**B-*CFHR1**B is strongly associated with aHUS.
5. An abnormal FHR protein has been identified in a female aHUS patient. This protein segregates with a novel *CFHR3:CFHR4* hybrid gene of paternal origin, and it likely explains the familial history of aHUS.
6. Six aHUS patients with anti-fH autoantibodies have been studied to characterize the IgG subclass and light chain type of the anti-fH autoantibodies; all autoantibodies are IgG3 isotype.
7. The recognition domain of anti-fH autoantibodies in the fH C-terminal region is the same for all patients, and in each patient at different time points.

8. The avidity index in samples from aHUS patients with anti-fH autoantibodies was different for each patient, but was unchanged in the samples at different time points within each patient.
9. Circulating fH:anti-fH complexes were detected in all samples from patients with anti-fH autoantibodies.

REFERENCIAS

- Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Corral P (2009) Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **114**: 4261-4271.
- Alcorlo M, López-Perrote A, Delgado S, Yébenes H, Subías M, Rodríguez-Gallego C, Rodríguez de Córdoba S, Llorca O (2015) Structural insights on complement activation. *FEBS J.* **282**: 3883-3891.
- Alayash AI (2011) Haptoglobin: old protein with new functions. *Clin Chim Acta.* **412**:493-498.
- Arlaud GJ, Gaboriaud C, Thielens NM, Budayova-Spano M, Rossi V, Fontecilla-Camps JC (2002) Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity. *Mol. Immunol.* **39**: 383-394.
- Barlow PN, Steinkasserer A, Norman DG, Kieffer B, Wiles AP, Sim RB, Campbell ID (1993) Solution Structure of a Pair of Complement Modules by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Mol. Biol.* **232**: 268-284.
- Bhattacharjee A, Reuter S, Trojnar E, Kolodziejczyk R, Seeberger H, Hyvärinen S, Uzonyi B, Szilágyi Á, Prohászka Z, Goldman A, Józsi M, Jokiranta TS (2015) The major autoantibody epitope on factor H in atypical hemolytic uremic syndrome is structurally different from its homologous site in factor H-related protein 1, supporting a novel model for induction of autoimmunity in this disease. *J. Biol. Chem.* **290**: 9500-9510.
- Blanc C, Roumenina LT, Ashraf Y, Hyvärinen S, Sethi SK, Ranchin B, Niaudet P, Loirat C, Gulati A, Bagga A, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Jokiranta TS, Frémeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA (2012) Overall neutralization of complement factor H by autoantibodies in the acute phase of the autoimmune form of atypical haemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.* **189**: 3528-3537.
- Blanc C, Togarsimalemath SK, Chauvet S, Le Quintrec M, Moulin B, Buchler M, Jokiranta TS, Roumenina LT, Frémeaux-Bacchi V, Dragon Durey MA (2015) Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, two diseases. *J. Immunol.* **194**: 5129-5138.
- Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Frémeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, Pinto S, Goodship TH, Alberti M, Ribes D, Valoti E, Remuzzi G, Noris M; European Working Party on Complement Genetics in Renal Diseases (2013) Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**: 475-486.

- Caesar JJ, Lavender H, Ward PN, Exley RM, Eaton J, Chittock E, Malik TH, Goicoechea De Jorge E, Pickering MC, Tang CM, Lea SM (2014) Competition between antagonistic complement factors for a single protein on *N. meningitidis* rules disease susceptibility. *Elife*. 2014 Dec 23; **3**. doi: 10.7554/eLife.04008.
- Campistol JM, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa L, Espinosa M, Grinyó JM, Macía M, Mendizábal S, Praga M, Román E, Torra R, Valdés F, Vilalta R, Rodríguez de Córdoba S (2015) An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: Diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia* **35**: 421-447.
- Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, Bettinaglio P, Bresin E, Pianetti G, Gamba S, Brioschi S, Daina E, Remuzzi G, Noris M; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP (2003) Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 3385-3395.
- Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP (2006) Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* **108**: 1267-1279.
- Catterall CF, Lyons A, Sim RB, Day AJ, Harris TJ (1987) Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *Biochem. J.* **242**: 849-856.
- Challis RC, Araujo GS, Wong EK, Anderson HE, Awan A, Dorman AM, Waldron M, Wilson V, Brocklebank V, Strain L, Morgan BP, Harris CL, Marchbank KJ, Goodship TH, Kavanagh D (2016) A De Novo Deletion in the Regulators of Complement Activation Cluster Producing a Hybrid Complement Factor H/Complement Factor H-Related 3 Gene in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* **27**:1617-1624.
- Chen Q, Wiesener M, Eberhardt HU, Hartmann A, Uzonyi B, Kirschfink M, Amann K, Buettner M, Goodship T, Hugo C, Skerka C, Zipfel PF (2014) Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *J. Clin. Invest.* **124**: 145-155.
- Cugno M, Gualtierotti R, Possenti I, Testa S, Tel F, Griffini S, Grovetti E, Tedeschi S, Salardi S, Cresseri D, Messa P, Ardisino G (2014) Complement functional tests for monitoring eculizumab treatment in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Thromb Haemost.* **12**:1440-1448.

- Davila S, Wright VJ, Khor CC, Sim KS, Binder A, Breunis WB, Inwald D, Nadel S, Betts H, Carrol ED, de Groot R, Hermans PW, Hazelzet J, Emonts M, Lim CC, Kuijpers TW, Martinon-Torres F, Salas A, Zenz W, Levin M, Hibberd ML; International Meningococcal Genetics Consortium. (2010) Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host susceptibility to meningococcal disease. *Nat. Genet.* **42**: 772-776.
- Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, Macher MA, Blouin J, Nivet H, Weiss L, Fridman WH, Frémeaux-Bacchi V (2005) Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical haemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**: 555-563.
- Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F, Loirat C, Blouin J, Sautes-Fridman C, Fridman WH, Frémeaux-Bacchi V (2009) The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Genet.* **46**: 447-450.
- Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodríguez de Córdoba S (2004) Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* **56**: 77-82.
- Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Buil A, Carreras Berges L, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S (2005) Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 703-712.
- Eyler SJ, Meyer NC, Zhang Y, Xiao X, Nester CM, Smith RJ (2013) A novel hybrid CFHR1/CFH gene causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* **28**:2221-2225.
- Fearon DT (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1971-1975.
- Ferreira VP, Herbert AP, Hocking HG, Barlow PN, Pangburn MK (2006) Critical role of the C-terminal domains of factor H in regulating complement activation at cell surfaces. *J. Immunol.* **177**: 6308-6316.
- Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C (2010) Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol. Immunol.* **47**: 2187-2197.
- Francis NJ, McNicholas B, Awan A, Waldron M, Reddan D, Sadlier D, Kavanagh D, Strain L, Marchbank KJ, Harris CL, Goodship TH (2012) A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **119**: 591-601.

- Fremaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaimé F, Dragon-Durey MA, Ngo S, Moulin B, Servais A, Provot F, Rostaing L, Burtey S, Niaudet P, Deschênes G, Lebranchu Y, Zuber J, Loirat C. (2013) Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **8**: 554-562.
- Gale DP, Maxwell PH (2013) C3 glomerulonephritis and CFHR5 nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**: 282-288.
- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R (1955) Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med. Wochenschr.* **85**: 905-909.
- Grassmann F, Cantsilieris S, Schulz-Kuhnt AS, White SJ, Richardson AJ, Hewitt AW, Vote BJ, Schmied D, Guymer RH, Weber BH, Baird PN (2016) Multiallelic copy number variation in the complement component 4A (C4A) gene is associated with late-stage age-related macular degeneration (AMD). *J Neuroinflammation* **13**(1):81. doi: 10.1186/s12974-016-0548-0.
- Harris CL, Abbott RJ, Smith RA, Morgan BP, Lea SM (2005) Molecular dissection of interactions between components of the alternative pathway of complement and decay accelerating factor (CD55). *J. Biol. Chem.* **280**: 2569-2578.
- Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF (1999) Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* **462**: 345-352.
- Hofer J, Giner T, Jozsi M (2014) Complement factor H-autoantibody-associated haemolytic uremic syndrome: pathogenesis, clinical presentation, and treatment. *Semin. Thromb. Hemost.* **40**: 431-443.
- Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Díaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U (2006) A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **38**: 1173-1177.
- Jokiranta TS, Jaakola VP, Lehtinen MJ, Pärepallo M, Meri S, Goldman A (2006) Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremic syndrome. *EMBO J.* **25**:1784-1794.
- Józsi M, Richter H, Löschmann I, Skerka C, Buck F, Beisiegel U, Erdei A, Zipfel PF (2005) FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur J Hum Genet.* **13**:321-329.
- Józsi M, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Hälbig S, Richter H, Kunert A, Licht C, Saunders RE, Perkins SJ, Zipfel PF, Skerka C (2006) Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**: 170-177.

Józsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, Zipfel PF, Skerka C (2008) Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* **111**: 1512-1514.

Józsi M, Reuter S, Nozal P, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, Uzonyi B (2014) Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol. Lett.* **160**: 163-171.

Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, Goicoechea de Jorge E, Rodríguez de Córdoba S (2015) Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol.* **36**: 374-384.

Khandelwal P, Gupta A, Sinha A, Saini S, Hari P, Dragon Durey MA, Bagga A (2015) Effect of plasma exchange and immunosuppressive medications on antibody titers and outcome in anti-complement factor H antibody-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **30**: 451-457.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD (1996) Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third component complement. *J. Immunol.* **156**: 4821-4832.

Laurence J (2012) Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS): making the diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol.* **10**(10 Suppl 17):1-12.

Law SKA, Reid KBM (1995) *Complement*, 2nd edn. Oxford University Press, IRL Press. ISBN 10: 0199633568 / ISBN 13: 9780199633562.

Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, Bingham C, Cohen DJ, Delmas Y, Douglas K, Eitner F, Feldkamp T, Fouque D, Furman RR, Gaber O, Herthelius M, Hourmant M, Karpman D, Lebranchu Y, Mariat C, Menne J, Moulin B, Nürnberger J, Ogawa M, Remuzzi G, Richard T, Sberro-Soussan R, Severino B, Sheerin NS, Trivelli A, Zimmerhackl LB, Goodship T, Loirat C (2013) Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **368**: 2169-2181.

Madico G, Welsch JA, Lewis LA, McNaughton A, Perlman DH, Costello CE, Ngampasutadol J, Vogel U, Granoff DM, Ram S (2006) The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J. Immunol.* **177**: 501-510.

Malik TH, Lavin PJ, Goicoechea de Jorge E, Vernon KA, Rose KL, Patel MP, de Leeuw M, Neary JJ, Conlon PJ, Winn MP, Pickering MC (2012) A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**: 1155-1160.

Martínez-Barricarte R, Recalde S, Fernández-Robredo P, Millán I, Olavarrieta L, Viñuela A, Pérez-Pérez J, García-Layana A, Rodríguez de Córdoba S; Spanish Multicenter Group on AMD (2012) Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**: 1087-1094.

Moore I, Strain L, Pappworth I, Kavanagh D, Barlow PN, Herbert AP, Schmidt CQ, Staniforth SJ, Holmes LV, Ward R, Morgan L, Goodship TH Marchbank KJ (2010) Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **115**: 379-387.

Morris KM, Aden DP, Knowles BB, Colten HR (1982) Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J. Clin. Invest.* **70**: 906-913.

Nester CM, Barbour T, de Cordoba SR, Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Goodship TH, Kavanagh D, Noris M, Pickering M, Sanchez Corral P, Skerka C, Zipfel P, Smith RJ (2015) Atypical aHUS: State of the art. *Mol. Immunol.* **67**: 31-42.

Oran AE, Isenman DE (1999) Identification of Residues within the 727-767 Segment of Human Complement Component C3 Important for Its Interaction with Factor H and with Complement Receptor 1 (CR1, CD35). *J. Biol. Chem.* **274**: 5120-5130.

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* **146**: 257-270.

Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ (1983) C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J. Immunol.* **131**: 1930-1935.

Pérez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodríguez de Córdoba S, Sanchez-Corral P (2001) Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 478-484.

Perkins SJ, Goodship TH (2002) Molecular modelling of the C-terminal domains of factor H of human complement: a correlation between haemolytic uraemic syndrome and a predicted heparin binding site. *J. Mol. Biol.* **316**: 217-224.

Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, Alpers CE, Bajema IM, Bedrosian C, Braun M, Doyle M, Fakhouri F, Fervenza FC, Fogo AB, Frémeaux-Bacchi V, Gale DP, Goicoechea de Jorge E, Griffin G, Harris CL, Holers VM, Johnson S, Lavin PJ, Medjeral-Thomas N, Paul Morgan B, Nast CC, Noel LH, Peters DK, Rodríguez de Córdoba S, Servais A, Sethi S, Song WC, Tamburini P,

Thurman JM, Zavros M, Cook HT (2013) C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int.* **84**: 1079-1089.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**: 785-797.

Rodríguez de Córdoba S, Díaz-Guillen MA, Heine-Suñer D (1999) An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol. Immunol.* **36**: 803-808.

Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P (2004). The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* **41**: 355-367.

Rodríguez de Córdoba S, Hidalgo MS, Pinto S, Tortajada A (2014) Genetics of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Semin. Thromb. Hemost.* **40**: 422-430.

Román-Ortiz E, Mendizabal Oteiza S, Pinto S, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S (2014) Eculizumab long-term therapy for pediatric renal transplant in aHUS with CFH/CFHR1 hybrid gene. *Pediatr. Nephrol.* **29**: 149-153.

Sambrook JEF, Frisch T, Maniatis T (1989) *Molecular cloning; a laboratory manual*, 2nd edn. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sánchez Chinchilla D, Pinto S, Hoppe B, Adragna M, Lopez L, Justa Roldan ML, Peña A, Lopez Trascasa M, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S (2014) Complement mutations in diacylglycerol kinase-ε-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 1611-1619.

Sánchez-Corral P, Melgosa M (2010) Advances in understanding the aetiology of atypical haemolytic huraemic syndrome. *Br J Haematol.* **150**:529-542

Sansbury FH, Cordell HJ, Bingham C, Bromilow G, Nicholls A, Powell R, Shields B, Smyth L, Warwicker P, Strain L, Wilson V, Goodship JA, Goodship TH, Turnpenny PD (2014) Factors determining penetrance in familial atypical haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Genet.* **51**:756-64.

Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW (2014) Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol.* **5**:415. doi: 10.3389/fphys.2014.00415.

Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT (2013) Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* **56**:170-80.

Skerka C, Timmann C, Horstmann RD, Zipfel PF (1992) Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *J. Immunol.* **148**: 3313-3318.

- Schneider MC, Exley RM, Chan H, Feavers I, Kang YH, Sim RB, Tang CM (2006) Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* **176**: 7566-7575.
- Strobel S, Abarrategui-Garrido C, Fariza-Requejo E, Seeberger H, Sánchez-Corral P, Józsi M (2011) Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* **80**: 397-404.
- Suwannalai P, Scherer HU, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Jol-van der Zijde CM, van Tol MJ, Drijfhout JW, Huizinga TW, Toes RE, Trouw LA (2011) Anti-citrullinated protein antibodies have a low avidity compared with antibodies against recall antigens. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 373-379.
- Tanaka K, Nakayama T, Mori R, Sato N, Kawamura A, Mizutani Y, Yuzawa M (2011) Associations of complement factor H (CFH) and age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2) genotypes with subtypes of polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**(10):7441-7444.
- Tortajada A, Yébenes H, Abarrategui-Garrido C, Anter J, García-Fernández JM, Martínez-Barricarte R, Alba-Domínguez M, Malik TH, Bedoya R, Cabrera Pérez R, López Trascasa M, Pickering MC, Harris CL, Sánchez-Corral P, Llorca O, Rodríguez de Córdoba S (2013) C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J. Clin. Invest.* **123**: 2434-2446.
- Tschopp J, Muller-Eberhard HJ, Podack ER (1982) Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9. *Nature* **298**: 534-538.
- Usher CL, McCarroll SA (2015) Complex and multi-allelic copy number variation in human disease. *Brief Funct Genomics* **14**:329-338.
- Valoti E, Alberti M, Tortajada A, Garcia-Fernandez J, Gastoldi S, Besso L, Bresin E, Remuzzi G, Rodriguez de Cordoba S, Noris M (2015) A novel atypical hemolytic uremic syndrome-associated hybrid CFHR1/CFH gene encoding a fusion protein that antagonizes factor H-dependent complement regulation. *J Am Soc Nephrol.* **26**:209-219.
- Venables JP, Strain L, Routledge D, Bourn D, Powell HM, Warwicker P, Díaz-Torres ML, Sampson A, Mead P, Webb M, Pirson Y, Jackson MS, Hughes A, Wood KM, Goodship JA, Goodship TH (2006) Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med.* **3** (10): e431.
- Walport MJ (2001a) Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**: 1058-1066.
- Walport MJ (2001b) Complement. Second of two parts. *N. Engl J. Med.* **344**: 1140-1144.

Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3268-3272.

Whaley K, Ruddy S (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med.* **144**: 1147-1163.

Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, Shi SF, Liu LJ, Yu F, Zhao MH, Novak J, Gharavi AG, Zhang H (2015) Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* **26**:1195-204.

Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J.* **24**:382-94.

Zipfel PF, Skerka C (1994) Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* **15**: 121-126.

Zipfel PF, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, Hoppe B, Routledge D, Strain L, Hughes AE, Goodship JA, Licht C, Goodship TH, Skerka C (2007) Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* **3**(3): e41.